







BRANCHED CYCLIC TETRASSACHARIDE, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME, AND USE**Publication number:** WO02072594**Publication date:** 2002-09-19**Inventor:** AGA HAJIME (JP); HIGASHIYAMA TAKANOBU (JP); WATANABE HIKARU (JP); SONODA TOMOHIKO (JP); KUBOTA MICHIO (JP)**Applicant:** HAYASHIBARA BIOCHEM LAB (JP); AGA HAJIME (JP); HIGASHIYAMA TAKANOBU (JP); WATANABE HIKARU (JP); SONODA TOMOHIKO (JP); KUBOTA MICHIO (JP)**Classification:****- international:** A61K9/00; A61K9/08; A61K9/20; A61K47/26; A61K47/40; C07H3/06; C12P19/18; A61K9/107; A61K9/00; A61K9/08; A61K9/20; A61K47/26; A61K47/40; C07H3/00; C12P19/00; A61K9/107; (IPC-7): C07H0/06; A23L1/30; A61K7/00; A61K47/26; C08B37/00; C12P19/00**- European:** A61K9/08; A61K8/60; A61K8/73; A61K9/00M3; A61K9/20H4B; A61K47/26; A61K47/40; A61Q1/06; A61Q11/00; A61Q17/04; A61Q19/00; A61Q19/02; A61Q19/10; C07H3/06; C07H3/06D; C12P19/18**Application number:** WO2002JP02213 20020308**Priority number(s):** JP20010067282 20010309**Also published as:** EP1380595 (A1)
 US7223570 (B2)
 US2004236097 (A1)**Cited documents:** WO0210361
 WO0190338
 US5786196**Report a data error here****Abstract of WO02072594**

A novel glycosyl derivative which is a cyclic tetrassacharide represented by cyclo{6)- alpha -D-glucopyranosyl-(1)3)- alpha -D-glucopyranosyl-(1)6)- alpha -D-glucopyranosyl-(1)3)- alpha -D-glucopyranosyl-(1)}. It is a branched cyclic tetrassacharide in which one or more hydrogen atoms of the hydroxyl groups have been replaced with an optionally substituted glycosyl group (provided that when the hydrogen atom of the hydroxyl group bonded to the 6-position carbon in each glucopyranosyl is the only hydrogen atom which has been replaced, the substituent is a group selected among glycosyl groups excluding D-glucosyl).

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

再公表特許 (A1)

(11) 国際公開番号

WO2002/072594

発行日 平成16年7月2日 (2004.7.2)

(43) 国際公開日 平成14年9月19日 (2002.9.19)

(51) Int. Cl. ⁷

C07H 3/08
A23L 1/00
A61K 7/00
A61K 7/16
A61K 7/48

F I

C07H 3/06
A23L 1/00
A61K 7/00
A61K 7/16
A61K 7/48

N
F

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2002-571508 (P2002-571508)	(71) 出願人	000155908
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/002213		株式会社林原生物化学研究所
(22) 国際出願日	平成14年3月8日 (2002.3.8)		岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
(31) 優先権主張番号	特願2001-67282 (P2001-67282)	(72) 発明者	阿賀 創
(32) 優先日	平成13年3月9日 (2001.3.9)		日本国岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		株式会社林原生物化学研究所内
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), JP, US	(72) 発明者	東山 隆信
			日本国岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
			株式会社林原生物化学研究所内
		(72) 発明者	渡辺 光
			日本国岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
			株式会社林原生物化学研究所内
		(72) 発明者	園田 智彦
			日本国岡山県岡山市下石井1丁目2番3号
			株式会社林原生物化学研究所内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分岐環状四糖とその製造方法ならびに用途

(57) 【要約】

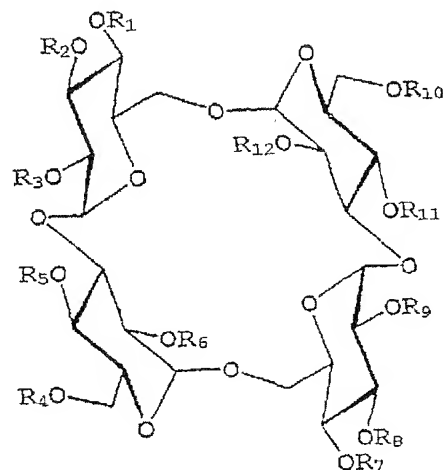
サイクロ {→6} - α-D-グルコピラノシル - (1→3) - α-D-グルコピラノシル - (1→6) - α-D-グルコピラノシル - (1→3) - α-D-グルコピラノシル - (1→) で表される環状四糖の新規なグリコシル誘導体を提供することを課題とし、環状四糖の水酸基における水素原子の1個又は2個以上が置換基を有することのあるグリコシル基で置換された分岐環状四糖 (ただし、該水素原子のうちの、6位の炭素に結合した水酸基における水素原子の1個のみが置換されている場合、該置換基はD-グルコシル基を除くグリコシル基から選ばれる基である。) を提供することにより解決する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サイクロ { $\rightarrow 6$ } - α - D - グルコピラノシル - ($1 \rightarrow 3$) - α - D - グルコピラノシル - ($1 \rightarrow 6$) - α - D - グルコピラノシル - ($1 \rightarrow 3$) - α - D - グルコピラノシル - ($1 \rightarrow$) で表される環状四糖のグリコシル誘導体であって、一般式 1 で表される構造を有する分岐環状四糖。

一般式 1 :



(一般式 1 において、 R_1 乃至 R_{12} は、それぞれ独立に、置換基を有することのあるグリコシル基又は水素原子である。ただし、 R_1 乃至 R_{12} の全てが水素原子であることはなく、また、 R_4 及び R_{10} のいずれか一方のみが置換基を有することのあるグリコシル基である場合、該グリコシル基である R_4 又は R_{10} は D - グルコピラノシル基を除くグリコシル基から選ばれる基である。)

【請求項 2】

一般式 1 における R_1 乃至 R_{12} から選ばれる 1 個又は 2 個以上の位置にあるグリコシル基が、それぞれ独立に、下記 (1) 乃至 (5) に示すグリコシル基から選ばれるいずれかの基である請求の範囲第 1 項に記載の分岐環状四糖：

(1) 置換基を有することのある { α - D - グルコピラノシル - ($1 \rightarrow 4$) - } $_n$ α - D - グルコピラノシル基 (ただし、 n は 0 以上の整数を意味し、 R_1 乃至 R_{12} における 2 個以上が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。)、

(2) 置換基を有することのある α - D - グルコピラノシル - ($1 \rightarrow 6$) - { α - D - グルコピラノシル - ($1 \rightarrow 3$) - α - D - グルコピラノシル - ($1 \rightarrow 6$) - } $_n$ α - D - グルコピラノシル基 (ただし、 n は 0 以上の整数を意味し、 R_1 乃至 R_{12} における 2 個以上が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。)、

(3) 置換基を有することのある { β - D - ガラクトピラノシル - ($1 \rightarrow 6$) - } $_n$ β - D - ガラクトピラノシル基 (ただし、 n は 0 以上の整数を意味し、 R_1 乃至 R_{12} における 2 個以上が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。)、

(4) 置換基を有することのある α - D - ガラクトピラノシル基、及び

(5) 置換基を有することのある β - D - キトサミニル基。

【請求項 3】

一般式 1 における R_1 及び R_3 又は R_7 が、置換基を有することのある { α - D - グルコピラノシル - ($1 \rightarrow 4$) - } $_n$ α - D - グルコピラノシル基 (ただし、 n は 0 以上の整数を意味し、 R_1 及び R_3 の両方が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。) である請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の分岐環状四糖。

【請求項 4】

10

20

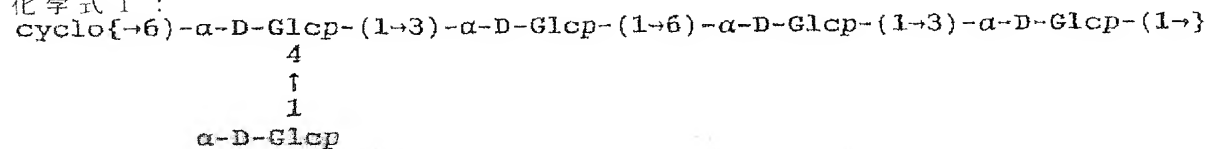
30

40

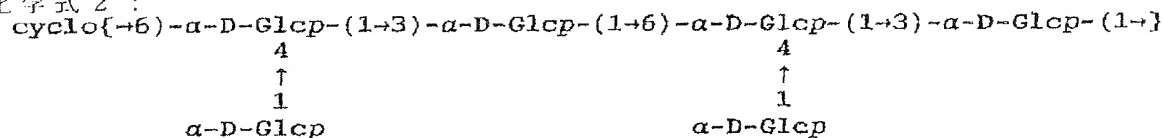
50

化学式 1 又は化学式 2 で表される請求の範囲第 3 項に記載の分岐環状四糖。

化学式 1 :



化学式 2 :



【請求項 5】

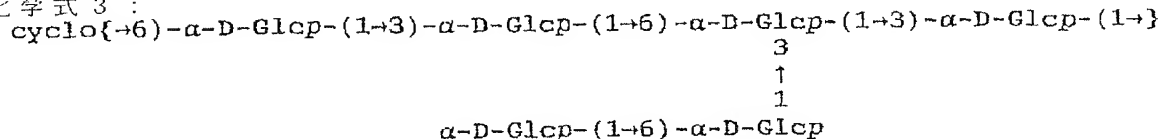
一般式 1 における R_2 及び \diagup 又は R_8 が、置換基を有することのある α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 6) - { α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 3) - α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 6) - }_n α -D-グルコピラノシル基 (ただし、 n は 0 以上の整数を意味し、 R_2 及び R_8 の両方が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。) である請求の範囲第 1 項、第 2 項又は第 3 項に記載の分岐環状四糖。

【請求項 6】

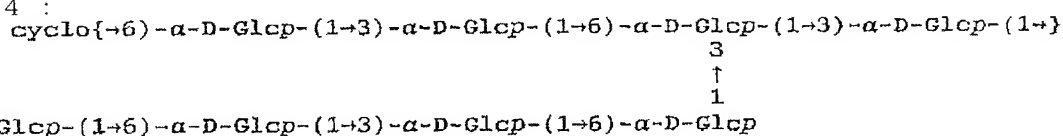
化学式 3、化学式 4 又は化学式 5 で表される請求の範囲第 5 項に記載の分岐環状四糖。

20

化学式 3 :

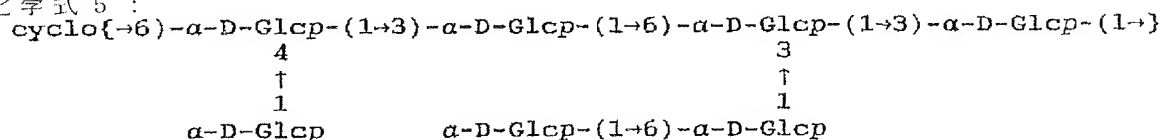


化学式 4 :



30

化学式 5 :



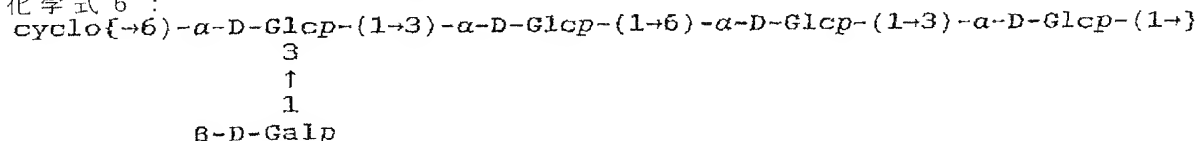
【請求項 7】

一般式 1 における R_2 及び \diagup 又は R_3 が、置換基を有することのある $\{\beta-D-$ ガラクトピラノシル- $(1 \rightarrow 6)-\}$ 。 $\beta-D-$ ガラクトピラノシル基（ただし、 n は 0 以上の整数を意味し、 R_2 及び R_3 の両方が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。）である請求の範囲第 1 項、第 2 項又は第 3 項に記載の分岐環状四糖。

【請求項 8】

化学式 6 で表される請求の範囲第 7 項に記載の分岐環状四糖。

化学式 6 :



【請求項9】

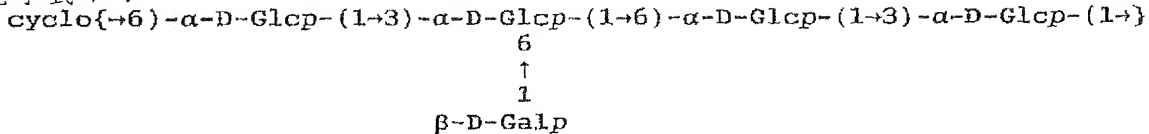
一般式 1 における R_1 及び \diagup 又は R_{10} が置換基を有することのある (β -D-ガラクト

ピラノシルー(1→6)-}。β-D-ガラクトピラノシル基(ただし、nは0以上の整数を意味し、R₄及びR₁₀の両方が当該基である場合、それぞれの当該基においてnは互いに独立しているものとする。)である請求の範囲第1項、第2項又は第3項に記載の分岐環状四糖。

【請求項10】

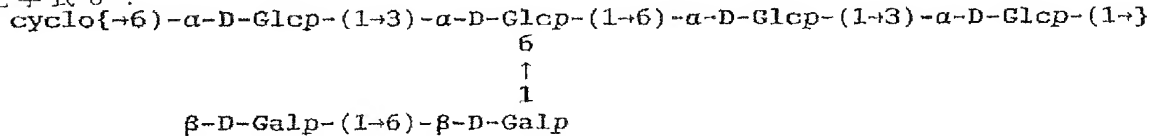
化学式7又は化学式8で表される請求の範囲第9項に記載の分岐環状四糖。

化学式7:



10

化学式8:



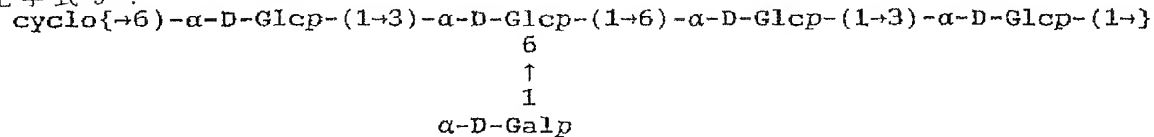
【請求項11】

一般式1におけるR₄及び/又はR₁₀が、置換基を有することのあるα-D-ガラクトピラノシル基である請求の範囲第1項、第2項又は第3項に記載の分岐環状四糖。

【請求項12】

化学式9で表される請求の範囲第11項に記載の分岐環状四糖。

化学式9:



20

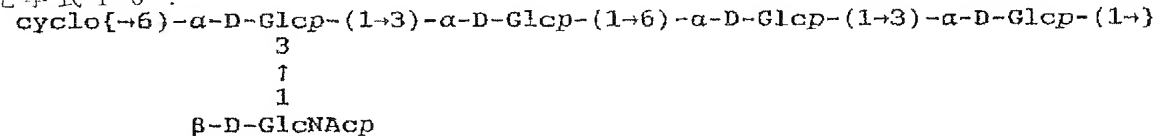
【請求項13】

一般式1におけるR₂及び/又はR₈が、置換基を有することのあるβ-D-キトサミニル基である請求の範囲第1項、第2項又は第3項に記載の分岐環状四糖。

【請求項14】

化学式10で表される請求の範囲第13項に記載の分岐環状四糖。

化学式10:



30

【請求項15】

溶液、非晶質粉末又は含蜜結晶の状態にある請求の範囲第1項乃至第14項のいずれかに記載の分岐環状四糖。

【請求項16】

請求の範囲第1項乃至第14項のいずれかに記載の分岐環状四糖の単離された結晶。

【請求項17】

化学式1、化学式2、化学式3、化学式6又は化学式7で表される分岐環状四糖の結晶である請求の範囲第16項に記載の単離された結晶。

【請求項18】

含水結晶又は無水結晶である請求の範囲第16項又は第17項に記載の単離された結晶。

【請求項19】

粉末X線回折法において、主たる回折角(2θ)として、下記(1)乃至(5)のいずれかに示す回折角を示す請求の範囲第16項、第17項又は第18項に記載の単離された結晶:

40

50

- (1) 8. 1°、12. 2°、14. 2°及び15. 4°、
- (2) 5. 6°、8. 8°、16. 9°及び21. 9°、
- (3) 7. 9°、12. 1°、17. 9°及び20. 2°、
- (4) 11. 0°、12. 3°、12. 8°及び24. 9°、及び
- (5) 8. 7°、13. 0°、21. 7°及び26. 1°。

【請求項 20】

請求の範囲第1項乃至第14項のいずれかに記載の分岐環状四糖と該分岐環状四糖以外の糖質とを含んでなる糖組成物。

【請求項 21】

溶液、非晶質粉末、含蜜結晶又は結晶質粉末の状態にある請求の範囲第20項に記載の糖組成物。 10

【請求項 22】

サイクロ {→6} - α-D-グルコピラノシル - (1→3) - α-D-グルコピラノシル - (1→6) - α-D-グルコピラノシル - (1→3) - α-D-グルコピラノシル - (1→) で表される環状四糖への単糖、オリゴ糖又は多糖からのグリコシル基の転移能を有する酵素の作用を利用する分岐環状四糖の製造方法であって、以下の二工程を含むことを特徴とする分岐環状四糖の製造方法：

- (1) 該環状四糖と該単糖、オリゴ糖又は多糖との混合物に該酵素を作用させて請求の範囲第1項乃至第14項のいずれかに記載の分岐環状四糖を生成させる工程、及び
- (2) 工程(1)で生成した分岐環状四糖を採取する工程。 20

【請求項 23】

請求の範囲第22項に記載の分岐環状四糖の製造方法であって、工程(1)に先だって実施する、環状四糖を製造するための以下の工程をさらに含むことを特徴とする分岐環状四糖の製造方法：

非還元末端の結合様式として α-1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質に、下記(A)の酵素活性を有する α-イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び下記(B)の酵素活性を有する α-イソマルトシル転移酵素を作用させて該環状四糖を生成させ、これを採取する工程：

(A) 非還元末端の結合様式として α-1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が n (n は2以上の整数を表す。) の糖質に作用して、還元力を実質的に増加することなく、非還元末端の結合様式として α-1, 6 グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として α-1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が n + 1 である糖質を生成する、 30

(B) 非還元末端の結合様式として α-1, 6 グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として α-1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質に作用して、サイクロ {→6} - α-D-グルコピラノシル - (1→3) - α-D-グルコピラノシル - (1→6) - α-D-グルコピラノシル - (1→3) - α-D-グルコピラノシル - (1→) で表される環状四糖を生成する。

【請求項 24】

環状四糖への単糖、オリゴ糖又は多糖からのグリコシル基の転移能を有する酵素として、シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ、β-ガラクトシダーゼ、α-ガラクトシダーゼ、リゾチーム、下記(A)に示す酵素活性を有する α-イソマルトシルグルコ糖質生成酵素、及び下記(B)に示す酵素活性を有する α-イソマルトシル転移酵素から選ばれる1種又は2種以上を用いる請求の範囲第22項又は第23項に記載の分岐環状四糖の製造方法： 40

(A) 非還元末端の結合様式として α-1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が n (n は2以上の整数を表す。) の糖質に作用して、還元力を実質的に増加することなく、非還元末端の結合様式として α-1, 6 グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として α-1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が n + 1 である糖質を生成する、 50

(B) 非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が 3 以上の糖質に作用して、サイクロ $\{ \rightarrow 6 \} - \alpha - D - \text{グルコピラノシル} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - D - \text{グルコピラノシル} - (1 \rightarrow 6) - \alpha - D - \text{グルコピラノシル} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - D - \text{グルコピラノシル} - (1 \rightarrow)$ で表される環状四糖を生成する。

【請求項 2 5】

単糖、オリゴ糖又は多糖として、グルコース 1-リン酸、マルトオリゴ糖、環状デキストリン、パノース、イソマルトシルグルコ糖質、ラクトース、メリビオース、N-アセチルキトオリゴ糖、デキストリン、グリコーゲン、液化澱粉、及びキチンから選ばれる 1 種又は 2 種以上を用いる請求の範囲第 2 2 項、第 2 3 項又は第 2 4 項に記載の分岐環状四糖の製造方法。 10

【請求項 2 6】

生成させた分岐環状四糖を、脱色、脱塩、カラムクロマトグラフィー及び結晶化から選ばれる 1 種又は 2 種以上の精製方法を含む工程により採取する請求の範囲第 2 2 項乃至第 2 5 項のいずれかに記載の分岐環状四糖の製造方法。

【請求項 2 7】

サイクロ $\{ \rightarrow 6 \} - \alpha - D - \text{グルコピラノシル} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - D - \text{グルコピラノシル} - (1 \rightarrow 6) - \alpha - D - \text{グルコピラノシル} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - D - \text{グルコピラノシル} - (1 \rightarrow)$ で表される環状四糖への単糖、オリゴ糖又は多糖からのグリコシル基の転移能を有する酵素の作用を利用するグリコシル基の転移方法であって、該環状四糖と該単糖、オリゴ糖又は多糖との混合物に該酵素を作用させて請求の範囲第 1 項乃至第 1 4 項のいずれかに記載の分岐環状四糖を生成させる工程を含むことを特徴とする環状四糖へのグリコシル基の転移方法。 20

【請求項 2 8】

請求の範囲第 1 項乃至第 1 4 項のいずれかに記載の分岐環状四糖を含んでなる組成物。

【請求項 2 9】

飲食物、化粧品又は医薬品としての請求の範囲第 2 8 項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、新規な分岐環状四糖に関するものであり、詳細には、サイクロ $\{ \rightarrow 6 \} - \alpha - D - \text{グルコピラノシル} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - D - \text{グルコピラノシル} - (1 \rightarrow 6) - \alpha - D - \text{グルコピラノシル} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - D - \text{グルコピラノシル} - (1 \rightarrow)$ で表される環状四糖のグリコシル誘導体である新規な分岐環状四糖とその製造方法ならびに用途に関するものである。 30

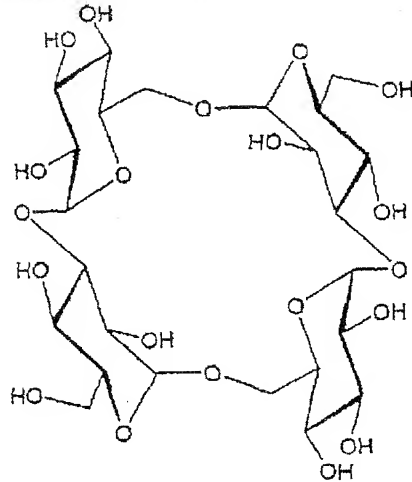
背景技術

グルコースを構成糖とする環状糖質としては、6 乃至 8 分子のグルコースが $\alpha-1, 4$ グリコシル結合で連結して環状構造を形成している $\alpha-$ 、 $\beta-$ 及び $\gamma-$ シクロデキストリンが従来からよく知られている。これらのシクロデキストリンは、還元力を示さない、呈味を示さない、疎水性物質を包接するなどの特性を有し、これらの特性を生かして、現在、諸種の分野で利用が進んでいる。また、シクロデキストリンの物性の改善や、シクロデキストリンへの新規な機能の付与などを目指した研究も盛んに進められている。例えば、特開平 6-9708 号公報、特開平 6-14789 号公報、特開平 6-16705 号公報、特開平 6-29880 号公報、特開平 10-25305 号公報などにはシクロデキストリンにグルコシル基、ガラクトシル基、マンノシル基、グルコサミニル基、N-アセチルグルコサミニル基などのグリコシル基を結合させて分岐構造をもたせた分岐シクロデキストリンとその製造方法や用途が種々提案されている。 40

一方、比較的近年報告された環状糖質としては、グレゴリー・エル・コテラ、『ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー』、第 226 巻、641 乃至 648 頁 (1994 年) に記載されている、グルコースが $\alpha-1, 3$ 及び $\alpha-1, 6$ 結合で交互に連結した環状四糖がある。この環状四糖の構造は、原子どうしの結合様式を表す化学式 A、な 50

らびに、グルコシル基どうしの結合様式を表す化学式 B に示すとおりである。なお、サイクロ {→6} - α-D-グルコピラノシル - (1→3) - α-D-グルコピラノシル - (1→6) - α-D-グルコピラノシル - (1→3) - α-D-グルコピラノシル - (1→) は、化学式 A 及び B と同じく上記環状四糖を意味するものである。本明細書を通じて、単に「環状四糖」という場合、この環状四糖を意味するものとする。

化学式 A :



10

20

化学式 B :

cyclo{→6}-α-D-Glcp-(1→3)-α-D-Glcp-(1→6)-α-D-Glcp-(1→3)-α-D-Glcp-(1→)

上記のコテラの論文には、グルコース残基が α-1, 3 結合及び α-1, 6 結合で交互に連結した多糖アルテルナンに加水分解酵素アルテルナナーゼを作用させることにより環状四糖が生成することが報告されている。この報告を契機として、環状四糖に対しても、シクロデキストリンと同様に、あるいはそれ以上に多方面で利用されることに期待がもたれ始めることとなった。しかしながら、この論文に記載された方法の場合、原料たるアルテルナンが入手容易ではなく、しかも、該原料からの環状四糖の生成率が工業的観点からすれば十分ではないことなどから、この方法は、環状四糖の工業的製造方法に有利に利用できるものではなかった。

30

先に、同じ特許出願人は、特願 2000-149484 号ならびにこの特許出願を基礎とする優先権主張出願である特願 2000-229557 号（国際公開番号第 WO 01/90338 A1 号）の明細書に、非還元末端にイソマルトシル基を有し、非還元末端以外の結合様式として α-1, 4 グルコシル結合を有するグルコース重合度が 3 以上の糖質（以下、「α-イソマルトシルグルコ糖質」という場合がある。）に作用して環状四糖を生成する新規酵素である α-イソマルトシル転移酵素を、また、特願 2000-233364 号ならびにこの特許出願を基礎とする優先権主張出願である特願 2000-234937 号（国際公開番号第 WO 02/10361 A1 号）の明細書に、グルコース重合度が 3 以上のマルトオリゴ糖に作用して α-イソマルトシルグルコ糖質を生成する新規酵素である α-イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を開示した。そして、特願 2000-233364 号ならびに特願 2000-234937 号（国際公開番号 WO 02/10361 A1 号）の明細書においては、α-イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び α-イソマルトシル転移酵素を組み合わせることで、食品製造用原料として汎用されている澱粉から環状四糖を主産物として生成させる方法を提案した。この提案により環状四糖の工業的製造への道が拓かれた。

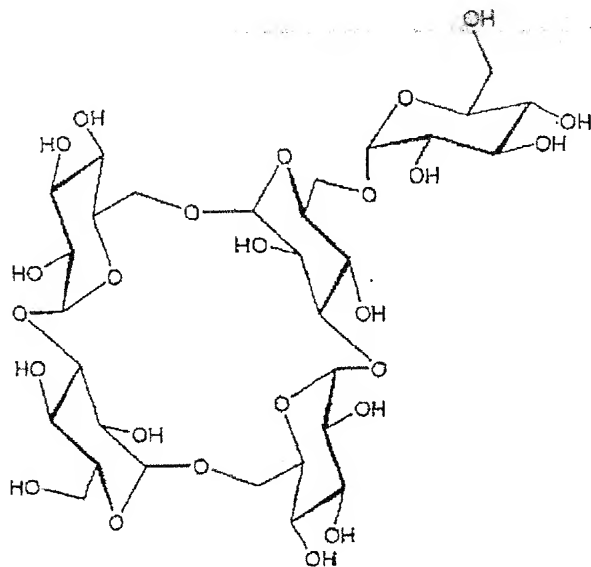
40

このように環状四糖に関する研究は近年始まったばかりという状況であり、未知の機能の解明や新規な用途の開発など、今後の研究の進展に大いに期待がもたれる。一方、環状四糖のグリコシル誘導体に関しては、上記のとおり環状四糖が現在までに公知であったとはいえ、その入手が必ずしも容易ではなかったことなどから、該誘導体の製造を主たる目的とした研究は現在のところ皆無である。唯一、化学式 C で示される 6-O-グルコピラノ

50

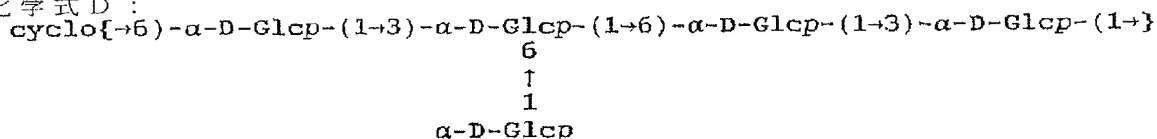
シル誘導体が、アルテルナンへのアルテルナナーゼの作用において極微量生成する副産物として単離・同定されたことが、上記のコテらの論文に記載されているのみである。なお、図みに、この6-O-グルコピラノシル誘導体の構造をグルコシル基どうしの結合様式で表す化学式は、化学式Dに示すとおりである。

化学式C：



10

化学式D：



シクロデキストリンの場合と同様に、環状四糖についてもグリコシル誘導体が多種に亘って提供されれば、それぞれについての特性の解析をとおして、環状四糖の用途開発に有用な知見がもたらされるとともに、環状四糖の物性・機能を改良ないしは改変した新規糖質の用途開発にも大きく貢献できるものと考えられる。

30

発明の開示

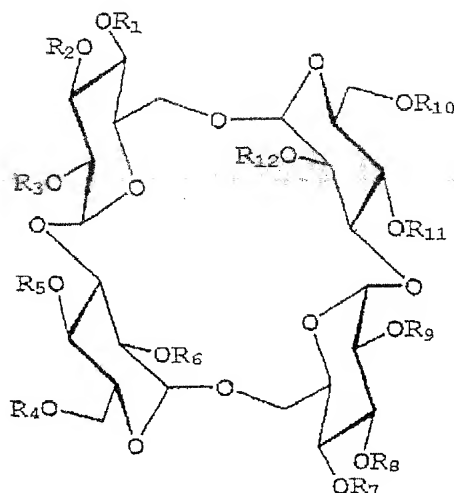
斯かる状況に鑑み、本発明の課題は、第一に環状四糖の新規なグリコシル誘導体を提供することにある、第二に該グリコシル誘導体の製造方法を提供することにある、第三に該グリコシル誘導体の用途を提供することにある。

上記の課題を解決するため、本発明者等は、先ずはじめに、澱粉部分分解物に α -イソマルトシル転移酵素と α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を作用させて環状四糖を生成させる本発明者等が確立した反応において、環状四糖の関連糖質が副生成することを見出し、これらの副生成物の単離と同定を試みた。その結果、これらはいずれも環状四糖の新規なグリコシル誘導体であることが確認された。引き続き、上記の両酵素による反応で調製した環状四糖を用いて、上記の両酵素ならびに公知の糖質関連酵素を用いて、諸種のグリコシル基供与体の共存下、酵素反応を行った。その結果、上記の両酵素や、シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、リゾチームやその他の糖転移酵素、糖加水分解、糖加リン酸分解酵素などの糖質関連酵素を用いることにより、新規なグリコシル誘導体が極めて多岐にわたって得られることが見出された。そして、以上のようにして得られた環状四糖のグリコシル誘導体を単離し、それらの性状を調べたところ、飲食品、化粧品、医薬品などの諸分野で有利に利用できることも確認された。本発明は、本発明者等による全く独自の以上の知見に基づいて為されたものである。

すなわち、本発明は、上記第一の課題を、環状四糖のグリコシル誘導体であって、一般式1で表される構造を有する分岐環状四糖を提供することにより解決するものである。

50

一般式 1 :



10

一般式 1 において、 R_1 乃至 R_{12} は、それぞれ独立に、置換基を有することのあるグリコシル基又は水素原子である。ただし、 R_1 乃至 R_{12} の全てが水素原子であることはなく、また、 R_4 及び R_{10} のいずれか一方のみが置換基を有することのあるグリコシル基である場合、該グリコシル基である R_4 又は R_{10} はD-グルコピラノシル基を除くグリコシル基から選ばれる基である。

20

また、本発明は、上記第二の課題を、環状四糖への単糖、オリゴ糖又は多糖からのグリコシル基の転移能を有する酵素の作用を利用する製造方法であって、該環状四糖と該単糖、オリゴ糖又は多糖との混合物に該酵素を作用させて本発明の分岐環状四糖を生成させる工程と、生成した分岐環状四糖を採取する工程とを含むことを特徴とする分岐環状四糖の製造方法を提供することにより解決するものである。

さらに、本発明は、上記第三の課題を、上記の本発明の分岐環状四糖を含んでなる、飲食物、化粧品、医薬品などとしての組成物を提供することにより解決するものである。

発明を実施するための最良の形態

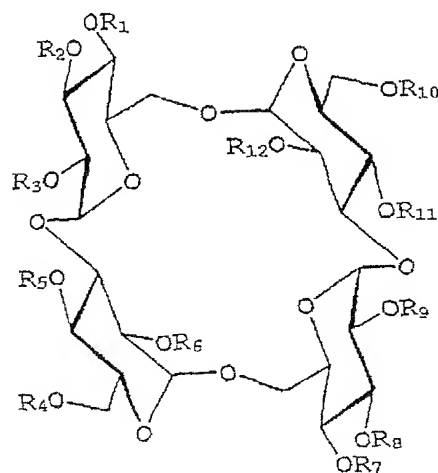
以下、本発明の実施の形態を個々に詳述する。

1. 分岐環状四糖

30

本発明が提供する新規分岐環状四糖は、一般式 1 で表される構造を有する。

一般式 1 :



40

一般式 1 において、 R_1 乃至 R_{12} は、それぞれ独立に、置換基を有することのあるグリコシル基又は水素原子である。ただし、 R_1 乃至 R_{12} の全てが水素原子であることはなく、また、 R_4 及び R_{10} のいずれか一方のみが置換基を有することのあるグリコシル基である場合、該グリコシル基である R_4 又は R_{10} はD-グルコピラノシル基を除くグリコシル基から選ばれる基である。なお、本発明でいうグリコシル基とは、糖質の分子構造

50

からアノマー水酸基が除かれた構造として表される原子団を意味する。本発明でいう糖質とは、ポリアルコールのアルデヒド、ケトン、酸、さらには、ポリアルコール自身のほか、アミノ糖などこれらの誘導体、ならびに、オリゴ糖や多糖などこれらの縮合体を含めた化合物群を総称する用語である。また、本発明でいう、置換基を有することのあるグリコシル基における置換基とは、糖質分子における非アノマー水酸基の1個以上、又は、糖質分子がアミノ糖の場合はその非アノマー水酸基及びアミノ基の1個以上における水素原子を置換しうる基を意味し、具体的には、例えば、アルキル基、アシル基、アセチル基、リン酸基、硫酸基などが挙げられる。

本発明の分岐環状四糖がその分岐部分に有するグリコシル基（一般式1における R_1 乃至 R_{12} から選ばれる1個又は2個以上の位置にあるグリコシル基）の例としては、具体的には、置換基を有することのある $\{\alpha\text{-D-グルコピラノシル-}(1\rightarrow4)\text{-}\}_n$ 、 $\alpha\text{-D-グルコピラノシル基}$ （ただし、 n は0以上の整数を意味し、 R_1 乃至 R_{12} における2個以上が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。）、置換基を有することのある $\alpha\text{-D-グルコピラノシル-}(1\rightarrow6)\text{-}\{\alpha\text{-D-グルコピラノシル-}(1\rightarrow3)\text{-}\alpha\text{-D-グルコピラノシル-}(1\rightarrow6)\text{-}\}_n$ 、 $\alpha\text{-D-グルコピラノシル基}$ （ただし、 n は0以上の整数を意味し、 R_1 乃至 R_{12} における2個以上が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。）、置換基を有することのある $\{\beta\text{-D-ガラクトピラノシル-}(1\rightarrow6)\text{-}\}_n$ 、 $\beta\text{-D-ガラクトピラノシル基}$ （ただし、 n は0以上の整数を意味し、 R_1 乃至 R_{12} における2個以上が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。）、置換基を有することのある $\alpha\text{-D-ガラクトピラノシル基}$ 、及び置換基を有することのある $\beta\text{-D-キトサミニル基}$ を挙げることができる。本発明の分岐環状四糖は、以上のグリコシル基から選ばれる1種又は2種以上をその分子内に有し得る。

当該分岐環状四糖のより具体的な第一の例としては、一般式1における R_1 及び/又は R_7 が、置換基を有することのある $\{\alpha\text{-D-グルコピラノシル-}(1\rightarrow4)\text{-}\}_n$ 、 $\alpha\text{-D-グルコピラノシル基}$ （ただし、 n は0以上の整数を意味し、 R_1 及び R_7 の両方が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。）である当該分岐環状四糖が挙げられる。その構造式としては、具体的には、後記実験3-4及び実験4-3に示す化学式1及び化学式2を例示することができる。

当該分岐環状四糖のより具体的な第二の例としては、一般式1における R_2 及び/又は R_8 が、置換基を有することのある $\alpha\text{-D-グルコピラノシル-}(1\rightarrow6)\text{-}\{\alpha\text{-D-グルコピラノシル-}(1\rightarrow3)\text{-}\alpha\text{-D-グルコピラノシル-}(1\rightarrow6)\text{-}\}_n$ 、 $\alpha\text{-D-グルコピラノシル基}$ （ただし、 n は0以上の整数を意味し、 R_2 及び R_8 の両方が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。）である当該分岐環状四糖が挙げられる。その構造式としては、具体的には、後記実験3-4に示す化学式3及び化学式4を例示することができる。

当該分岐環状四糖のより具体的な第三の詳細な例としては、一般式1における R_2 及び/又は R_8 が、置換基を有することのある $\{\beta\text{-D-ガラクトピラノシル-}(1\rightarrow6)\text{-}\}_n$ 、 $\beta\text{-D-ガラクトピラノシル基}$ （ただし、 n は0以上の整数を意味し、 R_2 及び R_8 の両方が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。）である当該分岐環状四糖が挙げられる。その構造式としては、具体的には、後記実験4-4に示す化学式6を例示することができる。

当該分岐環状四糖のより具体的な第四の例としては、一般式1における R_4 及び/又は R_{10} が置換基を有することのある $\{\beta\text{-D-ガラクトピラノシル-}(1\rightarrow6)\text{-}\}_n$ 、 $\beta\text{-D-ガラクトピラノシル基}$ （ただし、 n は0以上の整数を意味し、 R_4 及び R_{10} の両方が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。）である当該分岐環状四糖が挙げられる。その構造式としては、具体的には、後記実験4-5に示す化学式7及び化学式8を例示することができる。

当該分岐環状四糖のより具体的な第五の例としては、一般式1における R_4 及び/又は R_{10} が、置換基を有することのある $\alpha\text{-D-ガラクトピラノシル基}$ である当該分岐環状四

10

20

30

40

50

糖が挙げられる。その構造式としては、具体的には、後記実験 4 - 6 に示す化学式 9 を例示することができる。

当該分岐環状四糖のより具体的な第六の例としては、一般式 1 における R_2 及び / 又は R が、置換基を有することのある β -D-キトサミニル基（「キトサミニル基」は一般に「グルコサミニル基」とも呼ばれる。）である当該分岐環状四糖が挙げられる。その構造としては、具体的には、後記実験 4 - 7 に示す化学式 10 を例示することができる。

なお、以上の例は、本発明の分岐環状四糖を、その分岐部分の構成糖及び結合様式によって分類して個々に示したものであるけれども、当該分岐環状四糖はこのように分類される分岐部分をそれぞれ単独で有するのみならず、その 2 種以上を適宜組み合わせる場合もある。例えば、上記の第一の例に示される分岐部分の構造と、上記の第二乃至第六の例のいずれかに示される分岐部分の構造とを組み合わせる分岐環状四糖はその一例であり、その構造式としては、具体的には、後記実験 3 - 4 に示す化学式 5 を例示することができる。

以上のような本発明の分岐環状四糖は、以上説明したような構造を有する限り、特定の製造方法によるものに限定されず、例えば、有機合成法によって得られるものであっても、また、酵素反応によって得られるものであってもよい。しかしながら、下記に詳述する、本発明が開示する分岐環状四糖の製造方法によれば当該分岐環状四糖を効率的に製造することができるので、当該分岐環状四糖の諸種の分野での利用においては、本発明の製造方法によるものが有利である。本発明の分岐環状四糖は、例えば、糖質成分として実質的に当該分岐環状四糖のみが含まれる状態、通常、純度 90 % 以上、望ましくは純度 95 % 以上、より望ましくは、純度 97 % 以上に精製された状態で、溶液、非晶質粉末、含蜜結晶などの状態で、また、単離された結晶の状態を提供される。当該分岐環状四糖の結晶は、水や、低級アルコール、ジメチルホルムアミドなどの有機溶媒もしくは、これらの溶媒から適宜選ばれる 2 以上を混合した溶媒から晶出させ、常法にしたがって分蜜することにより単離することができる。水から晶出される当該分岐環状四糖の結晶は、無水結晶又は含水結晶として得られ、斯かる含水結晶の具体例としては、化学式 1、化学式 2、化学式 3、化学式 6 ならびに化学式 7 で表される当該分岐環状四糖の結晶を挙げることができる。これらの含水結晶は、常圧下で加熱したり、常温下で減圧環境下におくことなどの操作により無水結晶に変換することができる。当該分岐環状四糖の結晶の特定は、通常の粉末 X 線回折法によることができる。例えば、化学式 1、化学式 2、化学式 3、化学式 6 ならびに化学式 7 で表される分岐環状四糖の含水結晶は、この方法によるとき、主たる回折角（ 2θ ）として、通常、それぞれ、（1）8.1°、12.2°、14.2° 及び 15.4°、（2）5.6°、8.8°、16.9° 及び 21.9°、（3）7.9°、12.1°、17.9° 及び 20.2°、（4）11.0°、12.3°、12.8° 及び 24.9°、及び（5）8.7°、13.0°、21.7° 及び 26.1° を示す。また、当該分岐環状四糖は、これを主成分のひとつとして含む糖組成物としても提供される。当該分岐環状四糖を含む糖組成物は、当該分岐環状四糖を、そのいずれか 1 種のみ又は 2 種以上の合計として、全糖質成分あたり固形物重量換算で、通常、50 % 以上、好適な場合には、60 % 以上、より好適な場合には、70 % 以上、さらに好適な場合には、80 % 以上含有し、溶液、シラップ、ブロック、顆粒、含水結晶及び / 又は無水結晶を含有する結晶質粉末、非晶質粉末、含蜜結晶などの適宜の状態を提供される。

2. 分岐環状四糖の製造方法

本発明が提供する分岐環状四糖の製造方法は、環状四糖に単糖、オリゴ糖又は多糖からグリコシル基を転移する作用を有する酵素の作用を利用するものであり、環状四糖と該単糖、オリゴ糖又は多糖との混合物に該酵素を作用させて当該分岐環状四糖を生成させる工程と、生成した分岐環状四糖を採取する工程とを含むことを特徴とする。

2. 1. 環状四糖の調製

本発明による製造方法で用いる環状四糖の調製方法は問わず、例えば、（1）グレゴリー・エル・コテラ、『ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー』、第 226 巻、641 乃至 648 頁（1994 年）に記載された、多糖アルテルナンに加水分解酵素

アルテルナナーゼを作用させて環状四糖を生成させる方法や、(2) α -イソマルトシルグルコ糖質に α -イソマルトシル転移酵素を作用させて環状四糖を生成させる方法、(3) 還元末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質、例えば、澱粉部分分解物などに α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び α -イソマルトシル転移酵素を組み合わせる作用させて環状四糖を生成させる方法などによることができる。なお、本発明でいう α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び α -イソマルトシル転移酵素とは、それぞれ、下記(A)及び下記(B)の酵素活性を有する酵素を意味するものであり、ここに示される以外の酵素活性の有無や、理化学的性質、起源は問わない。

(A) 非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が n (n は2以上の整数を表す。) の糖質に作用して、還元力を実質的に増加することなく、非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が $n+1$ の糖質を生成する。

(B) 非還元末端の結合様式として $\alpha-1, 6$ グルコシル結合を有し、この非還元末端以外の結合様式として $\alpha-1, 4$ グルコシル結合を有するグルコース重合度が3以上の糖質に作用して、サイクロ $\{ \rightarrow 6 \} - \alpha - D - \text{グルコピラノシル} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - D - \text{グルコピラノシル} - (1 \rightarrow 6) - \alpha - D - \text{グルコピラノシル} - (1 \rightarrow 3) - \alpha - D - \text{グルコピラノシル} - (1 \rightarrow)$ で表される環状四糖を生成する。

因みに、上記(3)の方法による環状四糖の生成メカニズムは、概略としては以下のとおり推測される。

I) α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素が、グリコーゲンや澱粉部分分解物などの $\alpha-1, 4$ グルカン鎖の非還元末端グルコース基に作用し、そのグルコース基を他の $\alpha-1, 4$ グルカン鎖の非還元末端グルコース基の6位水酸基に分子間転移させ、非還元末端に α -イソマルトシル基を有する $\alpha-1, 4$ グルカン鎖を生成する。

II) α -イソマルトシル転移酵素が、非還元末端にイソマルトシル基を有する $\alpha-1, 4$ グルカン鎖に作用し、そのイソマルトシル基を、他の非還元末端にイソマルトシル基を有する $\alpha-1, 4$ グルカン鎖の非還元末端グルコース基の3位水酸基に分子間転移させ、非還元末端にイソマルトシル $-1, 3$ -イソマルトシル基を有する $\alpha-1, 4$ グルカン鎖を生成する。

III) 続いて、 α -イソマルトシル転移酵素が、その非還元末端にイソマルトシル $-1, 3$ -イソマルトシル基を有する $\alpha-1, 4$ グルカン鎖に作用し、分子内転移作用によってイソマルトシル $-1, 3$ -イソマルトシル基を $\alpha-1, 4$ グルカン鎖から切り離し、環状化して環状四糖を生成する。

IV) 切り離された $\alpha-1, 4$ グルカン鎖が、再度、I) から III) の反応を受けることによって、更に、環状四糖が生成する。

環状四糖の工業的製造を目的とする場合、かかるコスト及び労力の点で、上記(2)及び(3)の方法が比較的優れており、特に(3)の方法が望ましい。以下、上記(3)の方法による環状四糖の製造方法を中心に説明する。

2. 1. 1. α -イソマルトシル転移酵素及び α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素

α -イソマルトシル転移酵素及び α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、例えば、両酵素の一方又は両方を産生する微生物を培養し、その培養物に酵素の調製のための通常の方法を適用することにより得ることができる。同じ特許出願人により、平成12年4月25日付で、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6所在の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託された微生物バチルス・グロビスポルスC9 (受託番号FERM BP-7143)、及び、同じく平成12年4月25日付で、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6所在の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託された微生物バチルス・グロビスポルスC11 (受託番号FERM BP-7144) は、共に、両酵素の産生能を有するので両酵素の給源としてとりわけ有用である(以下、両微生物をそれぞれ「微生物C9」及び「微生物C11」とい

10

20

30

40

50

う場合がある)。

微生物 C 9 (F E R M B P - 7 1 4 3) 又は微生物 C 1 1 (F E R M B P - 7 1 4 4) を用いる場合の培地ならびに培養条件は、培地については、炭素源としては、例えば、植物由来の澱粉やフィトグリコーゲン、動物や微生物由来のグリコーゲンやプルラン、これらの部分分解物や、D-グルコース、D-フラクトース、ラクトース、スクロース、マンニトール、L-ソルビトール、糖蜜などの糖質、クエン酸、コハク酸などの有機酸が適宜利用できる。培地中の炭素源の濃度は、用いる炭素源の種類に応じて適宜選択される。窒素源としては、例えば、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機窒素化合物や、尿素、コーン・ステープ・リカー、カゼイン、酵母エキス、肉エキスなどの有機窒素化合物が適宜利用できる。無機成分としては、例えば、カルシウム塩、マグネシウム塩、カリウム塩、
10 ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、亜鉛塩、鉄塩、銅塩、モリブデン塩、コバルト塩などの塩類が適宜利用できる。さらに必要に応じてアミノ酸類やビタミン類なども適宜利用できる。

培養条件については、温度は、通常、4℃乃至40℃、好ましくは、20℃乃至37℃、pHは、通常、pH4乃至10、好ましくは、pH5乃至9で、通常、好氣的条件下で、10時間乃至150時間に互り行うのが好適である。培養に際して溶存酸素濃度を制御することもでき、例えば、0.5乃至20ppmの範囲となるように、通気量や攪拌速度を調節したり、通気に用いる気体の酸素濃度を加減したり、フエーメンター内の圧力を加減することも有利に実施できる。また、微生物が生育でき、 α -イソマルトシル転移酵素を
20 産生しうる条件を保持できる限り、回分培養、連続培養、半連続培養などいずれの培養方式を採用してもよい。

上記のような培養の結果得られる微生物 C 9 (F E R M B P - 7 1 4 3) 及び微生物 C 1 1 (F E R M B P - 7 1 4 4) の培養物は、通常、 α -イソマルトシル転移酵素及び α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を含んでいる。したがって、環状四糖の製造においては、目的に応じて、この培養物をそのままの状態に酵素剤として利用することも、また、両酵素を共に含むように、あるいは、両酵素をそれぞれ分離するように培養物から精製して酵素剤として利用することもできる。例えば、培養物から通常の固液分離によって菌体を除去して培養上清を採取し、この培養上清を、必要に応じて、蛋白質の濃縮のための慣用の方法、例えば、硫酸塩析、アセトン又はアルコール沈澱、減圧濃縮、膜濃縮など
30 にさらに供すれば、両酵素を共に含む部分精製された酵素剤を得ることができる。このように部分精製された酵素剤に、さらに必要に応じて、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィーなどの酵素精製のための慣用の方法を適宜組み合わせ適用し、分離される画分から、所期の酵素活性を示す画分をそれぞれ別個に採取すれば、所望のレベルにまで精製されたそれぞれの酵素剤を得ることもできる。

α -イソマルトシル転移酵素活性は以下のようにして測定することができる。パノースを濃度2% (w/v) となるように100mM酢酸緩衝液 (pH6.0) に溶解させた基質液0.5mlに酵素液0.5mlを加えて、35℃で30分間保持し、パノースからの環状四糖の生成反応を進行させる。この際、パノースから環状四糖とともにグルコースが生成する。該反応の後、反応液を10分間煮沸して反応を停止する。反応停止後の反応液を
40 グルコースオキシダーゼ法に供し、反応液中に生成したグルコース量を定量する。本発明において、 α -イソマルトシル転移酵素の活性1単位は、この条件下で1分間に1 μ molのグルコースを生成する酵素量と定義する。

α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は以下のようにして測定することができる。マルトトリオースを濃度2% (w/v) となるように100mM酢酸緩衝液 (pH6.0) に溶解させた基質液0.5mlに酵素液0.5mlを加えて、35℃で60分間保持し、マルトトリオースからのイソマルトシルマルトースの生成反応を進行させる。この際マルトトリオースから、イソマルトシルマルトースとともにマルトースも生成する。該反応の後、反応液を10分間煮沸して反応を停止する。反応停止後の反応液をマルトースを検出する通常のHPLCに供し、反応液中に生成したマルトース量を定量する。本発明にお
50

いて、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性の1単位は、この条件下で1分間に1 μmol のマルトースを生成する酵素量と定義する。

因みに、微生物C9 (FERM BP-7143) 及び微生物C11 (FERM BP-7144) から得られる両酵素の、上記で定義される両酵素活性を指標として確認される理化学的性質は、下記表1にまとめたとおりである。

表 1 :

	α -イソマルトシル転移酵素	α -イソマルトグルコ糖質生成酵素
分子量 (分析法)	約82,000乃至132,000ダルトン (SDS-ゲル電気泳動法)	約117,000乃至160,000ダルトン (SDS-ゲル電気泳動法)
等電点 (分析法)	pI約5.0乃至6.0 (アンフォライン含有電気泳動法)	pI約4.7乃至5.7 (アンフォライン含有電気泳動法)
至適温度 (分析条件)	約45°C乃至50°C (pH6.0で30分間反応)	約40°C乃至45°C (pH6.0で60分間反応) 約45°C乃至50°C (1mM Ca^{2+} 存在下で同条件)
至適pH (分析条件)	pH約5.5乃至6.0 (35°Cで30分間反応)	pH約6.0乃至6.5 (35°Cで60分間反応)
温度安定性 (分析条件)	約40°Cまで (pH6.0で60分間保持)	約35°C乃至40°Cまで (pH6.0で60分間保持) 約40°C乃至45°Cまで (1mM Ca^{2+} 存在下で同条件)
pH安定性 (分析条件)	pH約4.0乃至9.0 (4°Cで24時間保持)	pH約4.5乃至10.0 (4°Cで24時間保持)

なお、酵素剤が α -イソマルトシル転移酵素と α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を共に含む組成物の場合、該酵素剤は澱粉部分分解物から環状四糖を生成する活性を有する。澱粉部分分解物からの環状四糖生成活性（以下、単に「環状四糖生成活性」という場合、本活性を意味するものとする。）は以下のとおり測定することができる。澱粉部分分解物（商品名『パインデックス#100』、松谷化学株式会社製造）を濃度2%（w/v）となるように50mM酢酸緩衝液（pH6.0）に溶解させた基質液0.5mlに酵素液0.5mlを加えて、35°Cで60分間保持し、環状四糖生成反応を進行させる。この反応の後、反応液を10分間煮沸して反応を停止する。反応停止後の反応液に、 α -グルコシダーゼ（商品名『トランスグルコシダーゼL「アマノ」』、天野製薬製造）を70単位/mlで、及びグルコアミラーゼ（ナガセ生化学工業株式会社販売）を27単位/mlで含む50mM酢酸緩衝液（pH5.0）1mlを加え、50°Cで60分間処理した後、10分間煮沸して α -グルコシダーゼ及びグルコアミラーゼ処理を停止する。この後、反応液を、環状四糖を検出する通常のHPLCに供し、反応液中に生成した環状四糖を定量する。本発明において、澱粉部分分解物からの環状四糖生成活性の1単位は、この条件下で

1 分間に $1 \mu\text{mol}$ の環状四糖を生成する酵素量と定義する。

以上に示したような微生物からの調製方法以外に、 α -イソマルトシル転移酵素及び α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、例えば、組換えDNA技術によっても得ることができる。同じ特許出願人は、特願2000-350142号及び特願2001-5441号の明細書に、それぞれ、 α -イソマルトシル転移酵素及び α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素をコードする微生物C11 (FERM BP-7144) のDNAの塩基配列を開示している。これらの開示された塩基配列は、それぞれの出願明細書に記載のとおり、N末端にシグナルペプチドを有するそれぞれの酵素の前駆体に対応するコード領域の塩基配列とともに、5'非翻訳領域及び3'非翻訳領域の塩基配列を含んでいる。本明細書の配列表においては、特願2000-350142号明細書に開示された微生物C11の塩基配列から、 α -イソマルトシル転移酵素の前駆体に対するコード領域の塩基配列を抄出して配列番号1に、また、特願2001-5441号明細書に開示された微生物C11の塩基配列から、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の前駆体に対するコード領域の塩基配列を抄出して配列番号2にそれぞれ示している。これらの塩基配列を参照し、斯界において慣用の組換えDNA技術、例えば、DNAのクローニング法、部位特異的変異導入法、微生物などの細胞の形質転換法、DNAの人為的発現法などを適用すれば、両酵素は得ることができる。慣用の組換えDNA技術は、例えば、ジェイ・サンプルックら、『モレキュラー・クローニング、ア・ラボラトリー・マニュアル、第3版』（2001年、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー発行）に種々詳述されている。

2. 1. 2. α -イソマルトシル転移酵素及び α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を用いる環状四糖の調製

α -イソマルトシル転移酵素及び α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を用いて澱粉部分分解物などの基質から環状四糖を製造するには、基質、通常は、基質の水溶液に、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を一旦作用させた後、 α -イソマルトシル転移酵素を作用させるか、該基質に両酵素を同時に作用させればよく、環状四糖の生成効率の点では両酵素を同時に作用させるのが比較的望ましい。この方法で利用できる基質は、非還元末端の結合様式として α -1, 4グルコシル結合を有するグルコース重合度が2以上の糖質であればよく、例えば、マルトオリゴ糖、マルトデキストリン、アミロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、可溶性澱粉、液化澱粉、糊化澱粉及びグリコーゲンなどが例示できる。製造コストを考慮すると、始発原料として、例えば、とうもろこし、小麦、米などに由来する地上澱粉や、馬鈴薯、サツマイモ、タピオカなどの地下澱粉を用い、斯かる澱粉の懸濁液に液化型 α -アミラーゼを作用させるか、又は、澱粉懸濁液を酸性条件下で加熱して得られる液化澱粉に両酵素を作用させるのが好適である。環状四糖をより効率的に生成させるためには、液化澱粉のDE（デキストロース・エキバレント）は低いほどよく、通常、DE20以下、望ましくはDE12以下、さらに望ましくはDE5以下が好適である。液化澱粉への α -イソマルトシル転移酵素及び α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の作用に先立ち、又は該作用と並行して、澱粉枝切り酵素、例えば、プルナーゼやイソアミラーゼを作用させると、環状四糖の生成効率が向上する場合があるので、これらの酵素を利用することも有利に実施できる。

基質濃度は、環状四糖を生成するものである限り特に制限はない。1回の操作あたりの環状四糖の収量を高める上では基質濃度は高いほど好適であり、固形物濃度として、通常、0.1% (w/w) 以上、望ましくは、1% (w/w) 以上が好適である。基質は、水への溶解度を大きく超える濃度で含有する溶液の状態でも用いることもできるけれども、上記液化澱粉の場合、通常、固形分濃度40% (w/w) 以下、望ましくは、35% (w/w) 以下が、操作のし易さなどの点で好適である。

反応条件は、環状四糖を生成するものである限り特に制限はない。例えば、温度は、通常、常温から50℃まで、望ましくは、30℃乃至45℃が好適であり、pHは、通常、pH4.5乃至8、望ましくは、pH5.5乃至7が好適である。反応液中に、用いる酵素のいずれかを安定化する金属イオン、例えば、 Ca^{2+} や Mg^{2+} を共存させることも有利に実施できる。反応時間は、用いる酵素量に応じて、反応の進行状況を勘案して適宜選

択することができる。

基質に α -イソマルトシル転移酵素及び α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を作用させる際に、必要に応じて、他の糖転移酵素を併用することも有利に実施できる。例えば、シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼを併用すると、環状四糖の生成効率が、併用しない場合に比べて向上する場合がある。

また、基質に α -イソマルトシル転移酵素及び α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を作用させる際に用いる酵素剤として、両酵素を産生する微生物を利用することもできる。微生物を酵素剤として利用するには、例えば、両酵素の産生能を有する、微生物C9 (FERM BP-7143) 及びC11 (FERM BP-7144) などの微生物を、それが生育する条件下で所期の菌体数になるまで培養する。両微生物の培養のための条件は、酵素の製造のための上述の培養条件が有利に利用できる。そして培養の結果得られる培養物を、上記で述べた酵素剤の場合と同様に基質に作用させればよい。

以上のようにして酵素を作用させた反応液には環状四糖が生成している。この反応液をそのまま、環状四糖溶液として利用できる一方、反応液から環状四糖を精製して利用することもできる。環状四糖の精製には、公知の糖質の精製方法を適宜採用することができ、例えば、活性炭による脱色、H型及びOH型イオン交換樹脂による脱塩、イオン交換樹脂、活性炭、シリカゲルなどを用いるカラムクロマトグラフィーによる分画（通常、クロマト分離とも呼ばれる。）、アルコールやアセトンなどの有機溶媒を用いる分別沈殿、適度な分離性能を有する膜による分離、さらには、混在もしくは残存している他の糖質の分解・除去処理、例えば、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼなどのアミラーゼや α -グルコシダーゼなどの酵素処理、酵母などによる発酵処理、アルカリ処理などを必要に応じて適宜組み合わせ、環状四糖の精製度を高めることも有利に実施できる。以上のようにして精製された環状四糖もしくはこれを含む糖組成物は、濃縮、結晶化、乾燥、粉碎、溶解などの処理を適宜組み合わせ適用することにより、溶液、シラップ、プロック、粉末、顆粒、結晶など所望の性状とすることができる。

以上、 α -イソマルトシル転移酵素と α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を組み合わせ利用する環状四糖の製造方法を概説した。一方、 α -イソマルトシル転移酵素を単独で用いる方法（上記で述べた環状四糖の製造方法（2））においては、同様に当該酵素を製造した後、これを、上記の酵素反応条件に準じて、市販の又は常法により調製したパノースなどの α -イソマルトシルグルコ糖質に作用させ、必要に応じて、生成する環状四糖を上記と同様に精製すればよい。

2. 2. 環状四糖にグリコシル基を転移する酵素

本発明による製造方法で用いる酵素は、環状四糖に対して、単糖、オリゴ糖又は多糖（以下、当該製造方法で用いられる該単糖、オリゴ糖及び多糖を総称して「グリコシル基供与体」という。）からグリコシル基を転移して、上記で述べた一般式1で表される分岐環状四糖を生成する作用を有するものである限り、他の作用の有無や、起源は問わない。具体的には、例えば、シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ、 α -イソマルトシル転移酵素、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素、 β -ガラクトシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ及びリゾチームが挙げられる。以下、環状四糖へのグリコシル基の転移（以下、「グリコシル基の転移」を単に「グリコシル転移」という場合がある。）の観点から、それぞれの酵素の特性について概略を示す。

シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ (EC 2. 4. 1. 19.) は、結合様式として α -1, 4グルコシル結合を含むグルコース重合度2以上の糖質、例えば、マルトオリゴ糖、マルトデキストリン、アミロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、可溶性澱粉、液化澱粉、糊化澱粉、グリコーゲンなどを、通常、グリコシル基供与体とし、該供与体からグリコシル基を環状四糖に転移して、上記「1. 分岐環状四糖」の項で述べた第一の例に示される分岐環状四糖を生成する。

α -イソマルトシル転移酵素は、通常、パノースなどの α -イソマルトシルグルコ糖質をグリコシル基供与体とし、該供与体からグリコシル基を環状四糖に転移して、通常、上記「1. 分岐環状四糖」の項で述べた第二の例に示される分岐環状四糖、特に、化学式3又

は化学式 4 で示される分岐環状四糖を比較的効率的に生成する。

α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素は、結合様式として $\alpha-1$, 4 グリコシル結合を含むグルコース重合度 3 以上の糖質、例えば、重合度 3 以上のマルトオリゴ糖、マルトデキストリン、アミロデキストリン、アミロース、アミロペクチン、可溶性澱粉、液化澱粉、糊化澱粉、グリコーゲンなどを、通常、グリコシル基供与体とし、化学式 1 で示される分岐環状四糖を通常は生成する。

β -ガラクトシダーゼ (EC 3. 2. 1. 23.) は、通常、ラクトースをグリコシル基供与体とし、該供与体からグリコシル基を環状四糖に転移して、通常、上記「1. 分岐環状四糖」の項で述べた第三及び第四の例に示される分岐環状四糖を生成する。なお、 β -ガラクトシダーゼは、起源によって、生成する分岐環状四糖の種類や組成が異なる場合がある。例えば、バチルス・サーキュランス起源の該酵素は、化学式 6 に示される分岐環状四糖を比較的効率的に生成する一方、アスペルギルス・ニガー起源の同酵素は化学式 6 乃至 8 に示されるもののいずれをも生成する。

α -ガラクトシダーゼ (EC 3. 2. 1. 22.) は、通常、メリピオースをグリコシル基供与体とし、該供与体からグリコシル基を環状四糖に転移して、通常、上記「1. 分岐環状四糖」の項で述べた第五の例に示される分岐環状四糖、特に、化学式 9 で示される分岐環状四糖を比較的効率的に生成する。

リゾチーム (EC 3. 2. 1. 17.) は、N-アセチルキトサミン (別名 N-アセチルグルコサミン) を構成糖とし、結合様式として $\beta-1$, 4 グリコシル結合を含むオリゴ糖又は多糖、例えば、N-アセチルキトオリゴ糖やキチンなどを通常はグリコシル基供与体とし、該供与体からグリコシル基を環状四糖に転移して、通常、上記「1. 分岐環状四糖」の項で述べた第六の例に示される分岐環状四糖、特に、化学式 10 で示される分岐環状四糖を比較的効率的に生成する。

なお、上記では、個々の酵素を環状四糖に単独で作用させた際にそれぞれが主として触媒する転移反応を述べたけれども、以上のような酵素を 2 種以上組み合わせて利用することにより、さらに別の分岐環状四糖を生成させることもできる。例えば、シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼと α -イソマルトシル転移酵素とを組み合わせる用いて、両酵素による反応においてグリコシル基供与体となる適宜の糖質と環状四糖との共存下に両酵素を作用させれば、化学式 5 で示される分岐環状四糖が生成する場合がある。

さらに別の酵素の組み合わせにより多種多様な分岐環状四糖の生成が可能である。また、例えば、同じ特許出願人による特開平 10-304882 号公報に開示されたコージピオースホスホリラーゼや、グリコーゲンホスホリラーゼ (EC 2. 4. 1. 1.)、マルトースホスホリラーゼ (EC 2. 4. 1. 8.)、 α -グルコシダーゼ (EC 3. 2. 1. 20.)、オリゴ-1, 6-グルコシダーゼ (EC 3. 2. 1. 10.)、 β -グルコシダーゼ (EC 3. 2. 1. 21.) などの上記で例示した以外の糖質関連酵素であっても、環状四糖に対してグリコシル基供与体からグリコシル基を転移して、上記で述べた一般式 1 で表される分岐環状四糖を生成する作用を有するものである限り、本発明による製造方法に有利に利用できる。とりわけ、上記のコージピオースホスホリラーゼは、反応条件によっては、単糖の 1 種であるグルコース 1-リン酸をグリコシル基供与体として環状四糖にグリコシル基を転移して、一般式 1 における R_3 、 R_6 、 R_9 及び R_{12} から選ばれる 1 個又は 2 個以上がグリコシル基やコージピオシル基などの $\alpha-1$, 2 グリコシル結合を有するオリゴグルコシル基である分岐環状四糖を生成し得るので、目的に応じて有利に利用できる。

以上例示した酵素はいずれも公知の酵素であって、本発明の実施においては、目的に応じて市販の酵素剤を利用するか、あるいは、各酵素の調製についての報告例にしたがって調製すればよい。

2. 3. 環状四糖からの分岐環状四糖の製造

本発明による製造方法を実施するには、先ず、目的とする分岐環状四糖の構造に応じて用いる酵素 (以下、本項 2. 3. においては、「グリコシル転移酵素」という。) を選択し、これを、市販の酵素剤を購入したり常法により調製するなどして入手する。また、用い

10

20

30

40

50

る酵素の特性にしたがって、グリコシル基供与体としての糖質を市販の調製品を購入し、常法により調製するなどして入手する。環状四糖は、上記 2. 1. の項に示したいずれの方法にしたがって調製する。

上記のように入手される基質（環状四糖とグリコシル基供与体）とグリコシル転移酵素を用いて、基質の混合物、通常は、両者を共に含む水溶液に、グリコシル転移酵素を添加して反応させれば、反応混合物中に目的とする分岐環状四糖を生成させることができる。グリコシル転移酵素の作用条件は、所期の分岐環状四糖生成が起こる限り制限はない。水で反応を行う場合、基質の濃度は、反応温度におけるそれぞれの水への溶解度にもよるけれども、環状四糖については、通常、1 % (w/w) 乃至 40 % (w/w)、望ましくは、5 % (w/w) 乃至 35 % (w/w) とし、グリコシル供与体については、これが溶する範囲で可能な限り高濃度とするのが好適であり、例えば、環状四糖の濃度に対して可能であれば、1/2 倍の濃度以上、望ましくは、等濃度以上、さらに望ましくは、2 倍の濃度以上とするのが好適である。反応温度及び pH は、反応中にグリコシル転移酵素完全に失活する程度のものでなければよく、用いる酵素の酵素学的性質を勘案して適宜選択される。酵素量は、基質濃度と実施する反応時間に応じて、反応終了時点で所期の生物が得られるよう、適宜選択される。

斯くして得られる分岐環状四糖を含む反応混合物は、そのまま、当該分岐環状四糖を含む糖組成物として利用することもできるけれども、通常は、反応混合物から糖質を精製し利用される。糖質の精製は、一般的な方法にしたがえばよく、例えば、活性炭による脱色、H 型及び OH 型イオン交換樹脂による脱塩などが適宜採用でき、さらに必要に応じてイオン交換樹脂、活性炭、シリカゲルなどを用いるカラムクロマトグラフィーによる分離、アルコールやアセトンなどの有機溶媒を用いる分別沈澱、適度な分離性能を有する膜による分離、さらには、混在もしくは残存している他の糖質の分解・除去処理、例えば、 α -アミラーゼ、 β -アミラーゼ、グルコアミラーゼなどのアミラーゼや、 α -グルコシダーゼなどの酵素による処理、酵母などによる発酵処理、アルカリ処理などを適宜組み合わせて、目的とする分岐環状四糖の精製度を高めることも有利に実施できる。以上のようにして精製された分岐環状四糖もしくはこれを含む糖組成物は、濃縮、結晶化、乾燥、粉砕、溶解などの処理を適宜組み合わせて適用したり、さらに、必要に応じて、本発明の分岐環状四糖以外の適宜の糖質と混合して、溶液、シラップ、ブロック、含水結晶及び／又は無水結晶を含有する結晶質粉末、非晶質粉末、顆粒、単離された結晶、含蜜結晶など所定の状態とすることができる。

なお、因みに、上記 2. 1. 2. の項に示した、 α -イソマルトシル転移酵素と α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の作用による環状四糖の生成反応や、 α -イソマルトシル転移酵素の α -イソマルトシルグルコ糖質への作用による環状四糖の生成反応において、反応条件によりその生成量の増減はあるものの、通常、本発明の分岐環状四糖が副生成される。ここで副生成する分岐環状四糖のうち量的に主要なものは、化学式 1 で示されるもののほか、上記「1. 分岐環状四糖」の項で述べた第二の例に示される分岐環状四糖特に、化学式 3 及び化学式 4 で示されるもののや、化学式 5 で示されるものである。したがって、目的に応じて、上記の両酵素による反応産物や α -イソマルトシル転移酵素による反応産物から、分岐環状四糖を環状四糖と分離するように採取することにより、本発明の分岐環状四糖を得ることもできる。

3. 分岐環状四糖の用途

本発明の分岐環状四糖は、その基本構造が環状四糖と共通であることから、通常、環状四糖と同等の特性・機能を有する。したがって、当該分岐環状四糖は、基本的に、環状四糖と同様の目的で利用することができる。以下、同じ特許出願人による特願 2000-24937 号（国際公開番号第 WO 02/10361 A1 号）の明細書に開示された環状四糖の用途に準じて利用することができる本発明の分岐環状四糖の利用例を概説する。本発明の分岐環状四糖は、その分岐構造を構成するグリコシル基の種類や数によって異なるものの、通常、低甘味もしくは無甘味で上品な味質を示す非還元性の白色粉末で、安価な糖質であり、他の素材、特にアミノ酸、オリゴペプチド、蛋白質などのアミノ酸を有

る物質と混合、加工しても、褐変すること、異臭を発生することなく、混合した他の素材を損なうことも少ない。したがって、本発明の分岐環状四糖は、飲食物、化粧品、医薬品をはじめとする諸種の分野で、素材、基剤などとして配合して利用することができる。

本発明の分岐環状四糖は、包接能を有していることから、香氣成分、有効成分などの揮散、品質劣化を防止し、香氣成分、有効成分の安定化保持に極めて優れている。この際、必要ならば、シクロ（環状）デキストリン類、分岐シクロデキストリン類、シクロデキストラン類、シクロフラクタン類など他の環状糖質を併用することで、包接能による安定化を強化することにも有利に実施できる。シクロデキストリン類などの環状糖質としては、高純度のものに限る必要はなく、低純度の環状糖質、例えば、多量のマルトデキストリンとともに各種のシクロデキストリンを含有した澱粉部分分解物なども有利に利用できる。 10

環状四糖は、アミラーゼや α -グルコシダーゼによって分解されないことから、経口摂取しても消化吸収されず、また、腸内細菌によって醗酵されにくく、極めて低カロリーの水溶性食物繊維として利用することができる。また、環状四糖は、虫歯誘発菌などによっても、醗酵されにくく、虫歯を起こしにくい甘味料としても利用でき、さらに、口腔内での固形物の付着、固結を防止する機能をも併せもっている。一方、本発明の分岐環状四糖は、その基本構造が環状四糖と共通であることから、カロリーのある、又は虫歯誘発菌によって発酵されやすい通常の糖質と比べると、低カロリー糖質や低う蝕性糖質としての有用性が高い。しかも、本発明の分岐環状四糖自体は、無毒、無害の糖質であり、危険性がなく、安定な素材・基剤などとして有用であることにより、結晶製品の場合には、プルラン、ヒドロキシエチルスターチ、ポリビニルピロリドンなどの結合剤と併用して錠剤又は糖衣錠として利用することにも有利に実施できる。また、本発明の分岐環状四糖は、浸透圧調節性、賦形性、照り付与性、保湿性、粘性、他の糖の結晶防止性、難醗酵性などの性質を具備している。したがって、本発明の分岐環状四糖もしくはこれを含む糖組成物は、糖質調味料、呈味改良剤、品質改良剤、安定剤、変色防止剤、賦形剤などとして、飲食物、嗜好物、飼料、餌料、化粧品、医薬品などの各種組成物に有利に利用できる。 20

本発明の分岐環状四糖もしくはこれを含む糖組成物は、そのまま、上品な味質を不要するための調味料として使用できる。必要ならば、例えば、粉飴、ブドウ糖、異性化糖、砂糖、麦芽糖、トレハロース、蜂蜜、メープルシュガー、ソルビトール、マルチトール、ジヒドロカルコン、ステビオシド、 α -グリコシルステビオシド、ラカンカ甘味物、グリチルリチン、ソーマチン、L-アスパラチルフェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、アセスルファムK、スクラロース、グリシン、アラニンなどの他の甘味料と併用すること、又、デキストリン、澱粉、乳糖などのような増量剤と併用することもできる。とりわけ、エリスリトール、キシリトール、マルチトールなどの低カロリー甘味料や α -グリコシルステビオシド、ソーマチン、L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル、サッカリン、アセスルファムK及びスクラロースなどの1種又は2種以上の高甘味度甘味料と併用して、低カロリー甘味料又はダイエット甘味料などとして好適に利用することができる。 30

本発明の分岐環状四糖もしくはこれを含む糖組成物は、そのまま、または必要に応じて、増量剤、賦形剤、結合剤などと混合して、顆粒、球状、短棒状、板状、立方体、錠剤など各種形状に成形して使用することも随意である。 40

本発明の分岐環状四糖もしくはこれを含む糖組成物が呈する上品な味質は、甘味、酸味、塩から味、渋味、旨味、苦味などの呈味を有する各種の物質とよく調和し、耐酸性、耐熱性も大きいので、一般の飲食物の甘味付、呈味改良に、また品質改良などに有利に利用できる。例えば、醤油、粉末醤油、味噌、粉末味噌、もろみ、ひしお、フリカケ、マヨネーズ、ドレッシング、食酢、三杯酢、粉末すし酢、中華の素、天つゆ、麵つゆ、ソース、ケチャップ、焼き肉のタレ、カレールウ、シチューの素、スープの素、ダシの素、複合調味料、みりん、新みりん、テーブルシュガー、コーヒーシュガーなどの各種調味料への甘味料、更には、呈味改良剤、品質改良剤などとして使用することにも有利に実施できる。また、例えば、せんべい、あられ、おこし、求肥、餅類、まんじゅう、ういろう、あん類、羊 50

羹、水羊羹、錦玉、ゼリー、カステラ、飴玉などの各種和菓子、パン、ビスケット、クラッカー、クッキー、パイ、プリン、バタークリーム、カスタードクリーム、シュークリーム、ワッフル、スポンジケーキ、ドーナツ、チョコレート、チューインガム、キャラメル、ヌガー、キャンディーなどの各種洋菓子、アイスクリーム、シャーベットなどの氷菓、果実のシロップ漬、氷蜜などのシロップ類、フラワーペースト、ピーナッツペースト、フルーツペーストなどのペースト類、ジャム、マーマレード、シロップ漬、糖果などの果実、野菜の加工食品類、福神漬、べったら漬、千枚漬、らっきょう漬などの漬物類、たくあん漬の素、白菜漬の素などの漬物の素、ハム、ソーセージなどの畜肉製品類、魚肉ハム、魚肉ソーセージ、カマボコ、チクワ、天ぷらなどの魚肉製品、ウに、イカの塩辛、酢コンブ、さきすめ、ふぐのみりん干し、タラ、タイ、エビなどの田麩などの各種珍味類、海苔、山菜、するめ、小魚、貝などで製造される佃煮類、煮豆、ポテトサラダ、コンブ巻などの惣菜食品、乳製品、魚肉、畜肉、果実、野菜の瓶詰、缶詰類、合成酒、増醸酒、清酒、果実酒、発泡酒、ビールなどの酒類、珈琲、ココア、ジュース、炭酸飲料、乳酸飲料、乳酸菌飲料などの清涼飲料水、プリンミックス、ホットケーキミックス、即席ジュース、即席コーヒー、即席しるこ、即席スープなどの即席食品、更には、離乳食、治療食、ドリンク剤、ペプチド食品、冷凍食品などの各種飲食物への甘味付に、呈味改良に、品質改良などに有利に実施できる。また、家畜、家禽、その他は蜜蜂、蚕、魚などの飼育動物のための飼料、餌料などの嗜好性向上や物性改善などを目的で使用することもできる。その他、タバコ、練歯磨、口紅、リップクリーム、内服液、錠剤、トローチ、肝油ドロップ、口中清涼剤、口中香剤、うがい剤など各種の固形物、ペースト状、液状などで嗜好物、化粧品、医薬品などの各種組成物への嗜好性向上剤として、または呈味改良剤、矯味剤として、さらに品質改良剤、安定剤などとして有利に利用できる。品質改良剤、安定剤としては、有効成分、活性など失い易い各種生理活性物質またはこれを含む健康食品、医薬品などに有利に適用できる。例えば、インターフェロン α 、 β 、 γ 、ツモア・ネクロシス・ファクター α 、 β 、マクロファージ遊走阻止因子、コロニー刺激因子、トランスファーフアクター、インターロイキン I などのリンホカイン含有液、インシュリン、成長ホルモン、プロラクチン、エリトロポエチン、卵細胞刺激ホルモンなどのホルモン含有液、BCG ワクチン、日本脳炎ワクチン、はしかワクチン、ポリオ生ワクチン、痘苗、破傷風トキソイド、ハブ抗毒素、ヒト免疫グロブリンなどの生物製剤含有液、ペニシリン、エリスロマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、ストレプトマイシン、硫酸カナマイシンなどの抗生物質含有液、チアミン、リボフラビン、L-アスコルビン酸、肝油、カロチノイド、エルゴステロール、トコフェロールなどのビタミン含有液、EPA、DHA、アラキドン酸などの高度不飽和脂肪酸またはそのエステル誘導体、リパーゼ、エステラーゼ、ウロキナーゼ、プロテアーゼ、 β -アミラーゼ、イソアミラーゼ、グルカナーゼ、ラクターゼなどの酵素含有液、薬用人参エキス、スッポンエキス、クロレラエキス、アロエエキス、プロポリスエキスなどのエキス類またはローヤルゼリーなどの各種生理活性物質、更には、ウイルス、乳酸菌、酵母などの生菌ペーストなどの有効成分や活性を失うことなく、安定で高品質の液状、ペースト状または固状の健康食品や医薬品などを容易に製造できることとなる。

以上述べたような各種組成物に、本発明の分岐環状四糖もしくはこれを含む糖組成物を含有させる方法としては、その製品が完成するまでの工程に含有せしめればよく、例えば、混和、混捏、溶解、融解、浸漬、浸透、散布、塗布、被覆、噴霧、注入、晶析、固化など公知の方法が適宜選ばれる。その割合は、全重量に対する当該分岐環状四糖もしくはこれを含む糖組成物の固形物重量の占める百分率として、通常、0.1%以上、望ましくは1%以上含有せしめるのが好適である。

以上に示した、環状四糖と同様の用途以外に、本発明の分岐環状四糖は、ビフィズス活性を示す場合があるので、ビフィズス因子として、飲食物、健康食品、健康補助食品、医薬品などに配合して利用することもできる。この際に、ビフィズス活性を示す他の糖質、例えば、乳化オリゴ糖、N-アセチル-D-キトサミン（N-アセチルD-グルコサミン）、ラクツロースなどを併用することも有利に実施できる。また、本発明の分岐環状四糖は

、環状四糖の水溶液中での晶出を抑制する機能があることから、環状四糖の晶出抑制剤として利用することもできる。例えば、上記のいずれかの方法で得られた環状四糖の水溶液、又は、環状四糖とともに、グルコース、マルトース、パノースなどの還元性糖質を含む水溶液に、本発明の分岐環状四糖もしくはこれを含む糖組成物を添加すると、得られる溶液を濃縮することにより、環状四糖を、その本来の溶解度を超える濃度で含む環状四糖高含有溶液を得ることができる。また、必要に応じて、斯かる溶液は、更に水素添加処理して、溶液中に含まれる還元性糖質を糖アルコールに変換して用いることもできる。斯くして得られる環状四糖高含有溶液は、本発明の分岐環状四糖を含まない環状四糖溶液に比べて、タンク貯蔵、ポンプ輸送、タンクローリー輸送をより効率的に行うことが可能となる。したがって、本発明の分岐環状四糖は、環状四糖の工業的な取扱において極めて有用である。 10

以下、実験及び実施例に基づいて本発明をさらに詳細に説明する。

実験1：微生物の培養物からの環状四糖の単離と同定

パノース（株式会社林原生物化学研究所製造）5%（w/v）、酵母抽出物（商品名『アサヒミースト』、アサヒビール株式会社製造）1.5%（w/v）、リン酸二カリウム0.1%（w/v）、リン酸一ナトリウム・12水塩0.06%（w/v）、硫酸マグネシウム・7水塩0.05%（w/v）及び水からなる液体培地を500ml容三角フラスコに100ml入れ、オートクレーブで121℃、20分間滅菌した後、冷却した。この培地に、バチルス グロビスボルスC9（FERM BP-7143）を接種し、27℃、230rpmの条件で48時間回転振盪培養した。培養液を遠心分離して菌体を除去し、培養上清を得た。得られた培養上清を、120℃で15分間オートクレーブし、放冷した後、不溶物を遠心分離して除去し、上清を回収した。この上清中には、硫酸-メタノール法で陽性で、かつ、ジフェニルアミン-アニリン法で陰性の非還元性糖質の存在が確認された。 20

上記のオートクレーブ後の上清約90mlをpH5.0、45℃に調整した後、 α -グルコシダーゼ（商品名『トランスグルコシダーゼL「アマノ」』、天野製薬株式会社製造）を固形物1g当り1500単位とグルコアミラーゼ（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社販売）を固形物1g当り75単位添加して24時間処理し、続いて、水酸化ナトリウムでpH12に調整し、2時間煮沸して、本上清中の還元糖を分解した。この処理後の液を、濾過により不溶物を除去した後、イオン交換樹脂（商品名『ダイヤイオンPK218』及び『WA30』、三菱化学工業株式会社製造）を用いて脱色・脱塩し、更に、活性炭で脱色した後、カチオン交換樹脂（商品名『ダイヤイオンSK-1B』、三菱化学工業株式会社製造）とアニオン交換樹脂（商品名『IRA411』、オルガノ株式会社製造）で再度脱塩し、精密濾過した後、エバポレーターで濃縮し、凍結真空乾燥して固形物として約0.5gの非還元性糖質の粉末を得た。 30

上記で粉末として得た非還元性糖質の純度を高速液体クロマトグラフィー法（以下、「HPLC」と略記する。）で調べた。HPLCにおいて、カラムには『Shodex KS-801カラム』（昭和電工株式会社製造）を用い、溶離液には水（流速0.5ml/min）を用い、カラム内温度を60℃とし、溶出される糖質の検出を示差屈折計（商品名『RI-8012』、東ソー株式会社製造）を用いて行なった。第1図に示すように、溶出時間10.84分に単一ピークが検出された。このピーク面積から、本糖質の純度は99.9%以上と求められた。 40

上記の方法で得た非還元性糖質を、高速原子衝撃法による質量分析（FAB-MS）に供した。質量数649のプロトン付加分子イオンが顕著に検出され、本糖質の質量数は648であることが判明した。

上記の方法で得た非還元性糖質を、硫酸を用いて加水分解し、通常的气相色谱グラフィー法で構成糖を調べたところ、D-グルコースのみが検出され、上記で求めた質量数と非還元性という特性を考慮すると、本糖質はD-グルコース4分子からなる環状糖質であると考えられた。

上記の方法で得た非還元性糖質を核磁気共鳴法（以下、「NMR」と略記する）に供した 50

。その結果、第2図に示す ^1H -NMRスペクトルと、第3図に示す ^{13}C -NMRスペクトルが得られた。既知糖質のものとの異同を検討したところ、グレゴリー・エル・コテラ、『ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー』、第226巻、641乃至648頁（1994年）に記載された環状四糖のスペクトルと一致した。

以上の結果により、上記の方法で単離した非還元性糖質を環状四糖、すなわち、サイクロ $\{\rightarrow 6\}-\alpha\text{-D-グルコピラノシル-}(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-グルコピラノシル-}(1\rightarrow 6)-\alpha\text{-D-グルコピラノシル-}(1\rightarrow 3)-\alpha\text{-D-グルコピラノシル-}(1\rightarrow)$ と同定した。

実験2： α -イソマルトシル転移酵素及び α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素

実験2-1： α -イソマルトシル転移酵素及び α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を含む酵素剤 10

澱粉部分分解物（商品名『パインデックス#4』、松谷化学株式会社製造）4.0%（w/v）、酵母抽出物（商品名『アサヒミースト』、アサヒビール株式会社製造）1.8%（w/v）、リン酸ニカリウム0.1%（w/v）、リン酸ナトリウム・12水塩0.06%（w/v）、硫酸マグネシウム・7水塩0.05%（w/v）及び水からなる液体培地を500ml容三角フラスコに100mlずつ入れ、オートクレーブで121℃、20分間滅菌した後、冷却した。この培地に、パチルス・グロビスポルスC9（FERMBP-7143）を接種し、27℃、230rpmの条件で48時間回転振盪培養したものを種培養とした。

容量30Lのファーマンターに種培養の場合と同組成の液体培地を約20L入れ、加熱滅菌後、冷却して温度27℃に調整した後、種培養を1%（v/v）の割合で接種し、温度27℃、pH6.0乃至8.0に保持しつつ、48時間通気攪拌培養した。この培養液を10,000rpmで30分間遠心分離し、培養上清約18Lを回収した。回収した培養上清の α -イソマルトシル転移酵素活性は約1.5単位/ml、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性は約0.45単位/ml、環状四糖生成活性は約0.95単位/mlであった。 20

この培養上清を、限外濾過膜（商品名『API-2013』、旭化成工業株式会社製造）を用いて液量2Lにまで濃縮し、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素及び α -イソマルトシル転移酵素を含む酵素剤を得た。本酵素剤の環状四糖生成活性は約8.5単位/mlであった。 30

実験2-2：精製 α -イソマルトシル転移酵素

実験2-1の方法で得た、パチルス・グロビスポルスC9の培養上清約18L（ α -イソマルトシル転移酵素活性26,900単位）を、4℃の条件下、80%飽和硫酸で24時間塩析した。生成した沈殿を、10,000rpmで30分間遠心分離して回収し、10mMリン酸緩衝液（pH7.5）に溶解後、同緩衝液に対して透析し、透析内液を回収した。

上記の硫酸塩析後の透析内液を、イオン交換樹脂（商品名『セパピーズFP-DA13ゲル』、三菱化学株式会社製造、樹脂量1000ml）を充填したカラムに負荷し、非吸着画分を採取した。

上記のイオン交換樹脂精製画分を、1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液（pH7.0）40に対して透析した。透析内液を回収し、遠心分離により不溶物を除去した後、アフィニティーカラムクロマトグラフィーに供した。ゲルは、『セファクリルHR S-200ゲル』（アマシャム・バイオテック株式会社製造、ゲル量500ml）を用い、溶出は、濃度1Mから0Mまで直線的濃度勾配をもたせた硫酸溶液の通液により行った。硫酸濃度0M付近で溶出された、 α -イソマルトシル転移酵素活性を示す画分を採取した。

上記のアフィニティーカラム精製画分を、1M硫酸を含む10mMリン酸緩衝液（pH7.0）に対して透析した。透析内液を回収し、遠心分離により不溶物を除去した後、疎水カラムクロマトグラフィーに供した。ゲルは、『ブチルトヨパール650Mゲル』（東ソー株式会社製造、ゲル量350ml）を用い、溶出は、濃度1Mから0Mまで直線的濃度勾配をもたせた硫酸溶液の通液により行った。硫酸濃度0.3M付近で溶出された、 α 50

ーイソマルトシル転移酵素活性を示す画分を採取した。

上記の疎水カラム精製画分を、1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析した。透析内液を回収し、遠心分離により不溶物を除去した後、再度上記と同じ条件でアフィニティーカラムクロマトグラフィーに供し、活性画分を採取した。

上記の 2 度目のアフィニティーカラム精製画分は、アクリルアミド濃度 7.5 % (w/v) の SDS-PAGE において、分子量 $112,000 \pm 20,000$ ダルトンの位置に単一の蛋白質バンドを示した。また、 α -イソマルトシル転移酵素活性の測定と蛋白質定量により求めた比活性は約 26.9 単位/mg 蛋白質であった。斯くして α -イソマルトシル転移酵素の精製標品を得た。

実験 2-3 : 精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素

実験 2-1 の方法で得たバチルス・グロビスポルス C9 の培養上清約 18 L (α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性 8,110 単位) を、実験 2-2 の方法にしたがって、80 % 飽和硫酸による塩析、透析、イオン交換樹脂による精製に供した。

上記のイオン交換樹脂精製画分を、1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析した。透析内液を回収し、遠心分離により不溶物を除去した後、アフィニティーカラムクロマトグラフィーに供した。ゲルは、『セファクリル HR S-200 ゲル』(アマシャム・バイオテック株式会社製造、ゲル量 500 ml) を用い、溶出は、濃度 1 M から 0 M まで直線的濃度勾配をもたせた硫酸溶液の通液に続いて濃度 0 mM から 10 mM まで直線的濃度勾配をもたせたマルトテトラオース溶液の通液により行った。マルトテトラオース濃度 30 mM 付近で溶出された、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を示す画分を採取した。

上記のアフィニティーカラム精製画分を、1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析した。透析内液を回収し、遠心分離により不溶物を除去した後、疎水カラムクロマトグラフィーに供した。ゲルは、『ブチルトヨパール 650 M ゲル』(東ソー株式会社製造、ゲル量 350 ml) を用い、溶出は、濃度 1 M から 0 M まで直線的濃度勾配をもたせた硫酸溶液の通液により行った。硫酸濃度 0.3 M 付近で溶出された、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性を示す画分を採取した。

上記の疎水カラム精製画分を、1 M 硫酸を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析した。透析内液を回収し、遠心分離により不溶物を除去した後、再度上記と同じ条件でアフィニティーカラムクロマトグラフィーに供し、活性画分を採取した。

上記の 2 度目のアフィニティーカラム精製画分は、アクリルアミド濃度 7.5 % (w/v) の SDS-PAGE において、分子量 $140,000 \pm 20,000$ ダルトンの位置に単一の蛋白質バンドを示した。また、 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素活性の測定と蛋白質定量により求めた比活性は約 13.6 単位/mg 蛋白質であった。斯くして α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素の精製標品を得た。

なお、以上の実験 2-1 乃至実験 2-3 では、バチルス・グロビスポルス C9 からの酵素の調製結果を示したけれども、バチルス・グロビスポルス C11 (FERM BP-7144) から、上記の方法に準じて操作することにより両酵素の精製標品を得ることができ。因みに、実験 2-1 乃至実験 2-3 に準じて微生物 C11 から精製した両酵素の性質は以下のとおりであった。

(A) α -イソマルトシル転移酵素

SDS-PAGE における分子量 : $102,000 \pm 20,000$ ダルトン

比活性 : 約 29.6 単位/mg 蛋白質

(B) α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素

SDS-PAGE における分子量 : 137,000 乃至 20,000 ダルトン

比活性 : 13.4 単位/mg 蛋白質

実験 3 : 澱粉部分分解物への酵素作用による環状四糖の生成とこれに副生成する分岐環状四糖

実験 3-1 : 酵素反応

3.7 kg の澱粉部分分解物 (商品名『バインデックス #100』、松谷化学工業株式会

10

20

30

40

50

社製造)を、35 Lの10 mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)に溶解し、この溶液に、実験2-1の方法で得た酵素剤を、環状四糖生成活性として17500単位相当加え、30℃で2日間保持して反応させ、その後反応液を20分間煮沸して酵素を失活させた。この反応液を45℃に調整した後、11 g(137, 500単位)の α -アミラーゼ剤(商品名『ネオスピターゼPK2』、ナガセ生化学工業株式会社製造)及び44 g(140, 800単位)のグルコアミラーゼ剤(商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社製造)を加え、pH 6.0に調整した後、45℃で1日間保持して反応させ、その後反応液を20分間煮沸して酵素を失活させた。この反応液を常法により濾過し、濾液を逆浸透膜を用いて固形物濃度約16%(w/w)にまで濃縮した。この濃縮液を常法にしたがって脱色、脱塩、濾過、濃縮に供し、約3.5 kgの固形物を含む糖液を約6.1 kg 10 g得た。

この糖液を、実験1の方法で単離した環状四糖と公知の糖質を標準試料として用いて、以下のHPLCにより分析した。すなわち、クロマトグラフ装置『CCPM』(東ソー株式会社製造)、カラム『AQ-303 ODS』(株式会社ワイエムシー製造、内径4.6 mm×長さ25 cm)、溶離液として水(流速0.5 ml/分)を用い、カラム温度を40℃とし、溶出される糖質を示差屈折計(商品名『RI-8012』、東ソー株式会社製造)により検出した。この分析により検出された成分のうちピーク面積が比較的大きいものを、保持時間と、個々に付した名称及びピーク面積の相対値とともに表2に示す。

表2:

HPLCにおける保持時間 (分*)	名 称	ピーク面積**
10.5	環状四糖	43.8%
19.7	副生成物 1	10.6%
24.7	副生成物 2	3.3%
49.9	副生成物 3	0.5%
58.2	副生成物 4	0.3%

*, いずれもおおよその値である。

**, 認められた全てのピークの面積の合計を100としたときの相対値。

因みに、上記HPLCにおいては、多くの場合、分子量の大きいものほど保持時間が長くなるという傾向がある。このことから、表1にまとめた結果は、本実験による酵素反応が、通常、環状四糖とともに、環状四糖より分子量の大きい、すなわち、構成糖の数が多い糖質を副生成することを示している。

実験3-2: 環状四糖の調製

実験3-1の方法で得た糖液6.1 kgを、イオン交換樹脂(商品名『アンバーライトCR-1310』、Na型、オルガノ製造、樹脂量約225 L)を充填したカラム(内径13.5 cm×長さ160 cmのカラムを10本直列に連結)を用いてクロマト分離に供した。移動相には水(流速45 L/h)を用い、カラム温度は60℃とした。カラムからの溶出液を分画し、各画分の糖組成を以下の実験3-1に示したHPLCにより求めた。環状四糖を比較的多く含む画分を合一し、1530 gの固形物を含む糖液を得た。上記と同じ条件によるHPLCで分析し、ピーク面積に基づいて計算したところ、この合一した画分(環状四糖高含有画分)は、全糖質あたり、環状四糖を79.8%、イソマルトースを6.1%の割合で含むものであった。

環状四糖高含有画分の固形物として1310g相当を、pH5.0、50℃に調整した後、 α -グルコシダーゼ（商品名『トランスグルコシダーゼL「アマノ」』、天野製薬株式会社製造）を固形物1g当り1000単位とグルコアミラーゼ（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社販売）を固形物1g当り60単位添加して20時間処理した。この処理後の液を、濾過により不溶物を除去した後、カチオン交換樹脂（商品名『ダイヤイオンPK218』、三菱化学工業株式会社製造）とアニオン交換樹脂（商品名『IRA411』、オルガノ株式会社製造）を用いて脱塩し、濃縮した。この濃縮液を上記のクロマト分離の条件にしたがって分画し、環状四糖の純度が97%以上の画分を採取した。採取した画分を常法にしたがって脱色、脱塩、濾過、濃縮し、固形物約1260gを含む糖液を得た。この糖液を、固形物濃度約50%（w/w）に調整した後、円筒状のプラスチック容器に入れ、穏やかに回転させながら、温度を65℃から20℃にまで約20時間かけて降下させ、結晶を析出させた。分蜜により析出した結晶を採取し、60℃で3時間常圧乾燥し、544gの結晶粉末を得た。本品は、純度99.9%の環状四糖の結晶であり、水分を12.7%含むものであった。実験3-3：副生成物の単離

実験3-1の方法で得た糖液6.1kgを、実験3-2に記載したクロマト分離にしたがって分画し、各画分の糖組成を実験3-1に記載のHPLCにより分析した。副生成物1及び副生成物2を比較的多く含む画分を合一する（画分1）一方、副生成物3及び副生成物4を比較的多く含む画分を別途合一した（画分2）。画分1は固形物320gを含み、画分2は固形物150gを含んでいた。HPLCによるクロマトグラムのピーク面積より両画分の糖組成を求めた。画分1は、全糖質あたり、副生成物1を47.9%、副生成物2を14.9%含んでいた。画分2は、上記HPLCにおける保持時間が副生成物2より長い成分（副生成物3及び4を含む）を、全糖質あたり25%以上含んでいた。

上記の画分1を水酸化ナトリウムでpH11以上に保ちつつ、95℃以上に1時間保持して還元糖を分解した。この後、常法にしたがって、脱色、脱塩、濾過、濃縮した。濃縮液のうち、固形物重量として50g相当を、分取用液体クロマトグラフィーに供した。分取用カラムとして『YMC-Pack ODS-A R355-15 S-15 120A』（株式会社ワイエムシー製造）を、移動相として精製脱イオン水を用いた。溶出液を実験3-1に記載のHPLCにより分析し、副生成物1を純度97%以上で含む画分を固形物として20gと、副生成物2を純度96%以上で含む画分を固形物として5g得た。

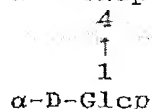
上記の画分2を、画分1の場合と同様に、還元糖の分解に供した後、脱色、脱塩、濾過、濃縮した。濃縮液のうち、固形物重量として10g相当を、引き続き画分1の場合と同様に、分取用クロマトグラフィーに供した。溶出液を実験3-1に記載のHPLCにより分析し、副生成物3を純度97%以上で含む画分を固形物として77mgと、副生成物4を純度97%以上で含む画分を固形物として77mg得た。

実験3-4：副生成物の同定

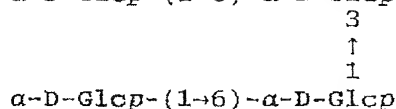
実験3-3で得た副生成物1乃至4の高含有画分を次に示す分析の全て又は一部に供した。（1）質量数の決定は高速原子衝撃法による質量分析により、（2）還元力の測定はソモジーネルソン法により、（3）構成糖の決定は硫酸による加水分解の後、糖質を分析するための通常のガスクロマトグラフィーにより、（4）生化学的解析は α -グルコシダーゼ（商品名『トランスグルコシダーゼL「アマノ」』、天野製薬株式会社）処理の後、実験3-1に記載のHPLCにより、（5）結合様式の推定は常法によるメチル化分析により、（6）比旋光度の測定は常法により、（7） ^{13}C -NMRは常法により行った。結果を以下に示す。

副生成物1は、質量数810であり、実質的に非還元性の糖質であった。構成糖はD-グルコースのみであり、質量数を考慮すると、副生成物1はD-グルコース5分子からなると考えられた。 α -グルコシダーゼ処理によって、環状四糖とグルコースを等モル生成した。メチル化分析では、2,3-ジメチル化物、2,3,4-トリメチル化物、2,4,6-トリメチル化物、及び2,3,4,6-テトラメチル化物が0.83:1.02:1.69:1のモル比で確認され、これらの構成比は1:1:2:1と考えられた。比旋光度は $[\alpha]_D^{25} + 246^\circ$ であった。 ^{13}C -NMRでは第4図に示すスペクトルが得

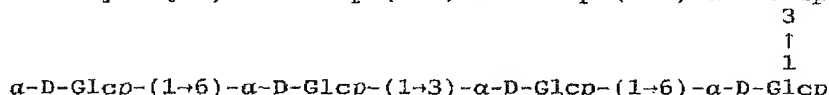
化学式 1 :



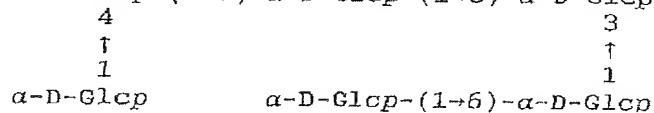
化学式 3 :



化学式 4 :



化学式 5 :



以上実験 3-4 で同定された分岐環状四糖の分岐部分の構成糖ならびに結合様式を総合すると、実験 3-1 の酵素反応による場合、副生成する分岐環状四糖は、通常、次の特徴を 50

示すと考えられる。すなわち、該分岐環状四糖は、一般式 1 に示される基本構造を有し、一般式 1 における R_1 乃至 R_{12} の 1 個又は 2 個以上が、置換基を有することのある α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 6) - { α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 3) - α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 6) - }_n α -D-グルコピラノシル基 (ただし、n は 0 以上の整数を意味し、 R_1 乃至 R_{12} における 2 個以上が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。) であり、比較的多くの場合は、 R_2 及び/又は R_3 が α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 6) - { α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 3) - α -D-グルコピラノシル- (1 \rightarrow 6) - }_n α -D-グルコピラノシル基 (ただし、n は 0 以上の整数を意味し、 R_2 及び R_3 の両方が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。) である。

10

実験 4 : 単離酵素による環状四糖へのグリコシル転移

実験 4-1 : α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素によるグリコシル転移

実験 3-2 の方法で得た環状四糖を 20% (w/w) で、マルトペンタオース (株式会社林原生物化学研究所製造) を 10% (w/w) で含む 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に、実験 2-3 の方法で得た精製 α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素をマルトペンタオース 1 g あたり 3 単位加えて、30℃で 24 時間反応させ、その後、反応液を 20 分間煮沸して酵素を失活させた。

上記の反応液を pH 5.0 に調製した後、反応液中の固形物 1 g あたり 500 単位のグルコアミラーゼ (商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社販売) 500 単位を加え、50℃で 1 時間反応させ、その後、反応液を 10 分間煮沸して酵素を失活させた。グルコアミラーゼ処理後の反応液を、常法により、メンブラン濾過、脱塩した後、実験 3-1 に示した HPLC により分析した。HPLC での保持時間により実験 3-3 及び実験 3-4 で単離・同定した分岐環状四糖との異同を調べたところ、この反応液には、全糖質あたり、化学式 1 で表される分岐環状四糖が 17.3% (HPLC におけるピーク面積比による) 含まれていることが判明した。この結果は、環状四糖に α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素を作用させることにより本発明の分岐環状四糖を効率よく生成させることができることを示している。

20

実験 4-2 : α -イソマルトシル転移酵素によるグリコシル転移

実験 3-2 の方法で得た環状四糖を 20% (w/w) で、パノース (株式会社林原生物化学研究所製造) を 10% (w/w) で含む 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) に、実験 2-2 の方法で得た精製 α -イソマルトシル転移酵素をパノース 1 g あたり 30 単位加えて、30℃で 24 時間反応させ、その後、反応液を 20 分間煮沸して酵素を失活させた。

30

この反応液を、常法により、メンブラン濾過、脱塩した後、実験 3-1 に示した HPLC により分析した。HPLC での保持時間により実験 3-3 及び実験 3-4 で単離・同定した分岐環状四糖との異同を調べたところ、この反応液には、全糖質あたり、化学式 3 で表される分岐環状四糖が 4.9% (HPLC におけるピーク面積比による) 含まれていることが判明した。この結果は、環状四糖に α -イソマルトシル転移酵素を作用させることにより本発明の分岐環状四糖を効率よく生成させることができることを示している。

実験 4-3 : シクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ (CGTase) によるグリコシル転移

40

実験 4-3 (a) : 酵素反応

実験 3-2 の方法で得た環状四糖 10 g と α -シクロデキストリン (株式会社林原生物化学研究所製造) 10 g を 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.5) 30 g に溶解し、パチルス・ステアロサーモフィラスの CGTase (株式会社林原生物化学研究所製造) を α -シクロデキストリン 1 g あたり 10 単位加えて 50℃で 24 時間反応させ、その後、反応液を 20 分間煮沸して酵素を失活させた。

上記の反応液に 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) 350 g とグルコアミラーゼ (商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社販売) 2000 単位を加え、40℃で 4 時間反応させ、その後、反応液を 20 分間煮沸して酵素を失活させた。

50

上記の方法で得た C G T a s e による反応液及び、C G T a s e に続いてグルコアミラーゼを作用させた反応液を実験 3 - 1 に示した H P L C により分析した。別途、これと同じ条件で、環状四糖及びグルコースを分析し、両反応液中に含まれる成分の特定を試みた。C G T a s e 反応液の分析結果を第 8 a 図に、グルコアミラーゼ反応液の分析結果を第 8 b 図にそれぞれ示す。

第 8 a 図及び第 8 b 図に共通して認められる保持時間約 10 分のピーク X は環状四糖のピークであり、第 8 b 図に特有の保持時間約 6 分のピーク G はグルコースのピークである。第 8 a 図及び第 8 b 図に示すとおり、C G T a s e 反応液には、環状四糖より保持時間の長い諸種の新たな成分が含まれ（第 8 a 図）、グルコアミラーゼ反応液においては、これらの成分は、2 つの成分（ピーク 1 及びピーク 2）を除いてほぼ完全に消失していた（第 8 b 図）。以上の結果は、第 8 a 図に認められる環状四糖以外のピークは、環状四糖にグルコシル基が 1 個以上結合したグリコシル誘導体のピークであり、第 8 b 図において環状四糖より長い保持時間の位置に認められる 2 個のピーク（ピーク 1 及びピーク 2）は、環状四糖に対して、グルコシル基が 1 箇所に 1 個結合したグルコシル誘導体であることを示唆している。グルコアミラーゼ反応液中のこれら 2 個の成分の保持時間を、個々に付した名称及びピーク面積の相対値とともに表 3 に示す。

表 3 :

HPLCにおける保持時間 (分*)	名 称	ピーク面積**
18.7	C G T a s e 生成物 1	約35%
38.7	C G T a s e 生成物 2	約22%

*, いずれもおおよその値である。

**, 認められた全てのピークの面積の合計を 100 としたときの相対値。

実験 4 - 3 (b) : 反応生成物の単離と同定

実験 4 - 3 (a) の方法で得たグルコアミラーゼ反応液を膜濾過した後、カチオン交換樹脂（商品名『ダイヤイオン P K 2 1 8』、三菱化学工業株式会社製造）とアニオン交換樹脂（商品名『I R A 4 1 1』、オルガノ株式会社製造）を用いて脱塩し、濃縮した。この濃縮液を実験 3 - 2 に示したクロマト分離の条件にしたがって分画し、各画分を実験 3 - 1 に示した H P L C で分析し、C G T a s e 生成物 1 及び 2 をそれぞれ純度 97 % 以上で含む画分を採取した。

上記の C G T a s e 生成物 1 の高含有画分を常法により ^{13}C -NMR に供したところ、得られたスペクトルは、実験 3 - 4 に結果を示した副生成物 1（化学式 1）の ^{13}C -NMR スペクトル（第 4 図）と一致した。このことから、C G T a s e 生成物 1 を、化学式 1 で表される分岐環状四糖と同定した。

上記の C G T a s e 生成物 2 の高含有画分を実験 3 - 4 に示した 7 項目の分析に準じて分析した。C G T a s e 生成物 2 は、質量数 972 であり、実質的に非還元性の糖質であった。構成糖は D-グルコースのみであり、質量数を考慮すると、同生成物は D-グルコース 6 分子からなると考えられた。α-グルコシダーゼ処理によって、環状四糖とグルコースを 1 : 2 のモル比で生成した。メチル化分析では、2, 3-ジメチル化物、2, 4, 6-トリメチル化物、及び 2, 3, 4, 6-テトラメチル化物が 0.89 : 1 : 1.24 のモル比で確認され、これらの構成比は 1 : 1 : 1 と考えられた。比旋光度は $[\alpha]^{25}_{\text{D}} + 241^{\circ}$ であった。 ^{13}C -NMR では第 9 図に示すスペクトルが得られた。シグナルの帰属を、上記実験 3 - 4 で述べた他の糖質ならびに環状四糖についての帰属の結果とあわせて表 4 に示す。

表 4 :

(その1)

炭素番号	化学シフト (ppm)					
	環状四糖	副生成物1*	副生成物2*	副生成物3*	副生成物4*	CGTase2*
1a	99.34	99.24	99.46	99.40	99.44	99.49
2a	74.28	75.49	72.84	72.87	72.80	75.72
3a	75.45	75.75	82.47	82.98	82.45	75.98
4a	73.35	81.18	73.81	73.72	73.76	81.38
5a	72.78	71.14	72.45	72.46	72.38	71.34
6a	70.22	70.27	70.17	70.10	69.98	70.47
1b	101.20	101.18	101.17	101.08	101.13	101.43
2b	72.64	72.71	72.64	72.63	72.58	72.91
3b	77.31	77.58	77.23	77.13	77.26	77.93
4b	73.62	73.58	73.62	73.65	73.52	73.76
5b	74.23	74.22	74.25	74.28	74.20	74.42
6b	62.88	62.87	62.88	62.87	62.84	63.08
1c	—	99.35	99.32	99.28	99.18	—
2c	—	74.22	74.25	74.28	75.47	—
3c	—	75.49	75.45	75.43	75.77	—
4c	—	73.34	73.36	73.37	81.14	—
5c	—	72.71	72.78	72.75	71.09	—
6c	—	70.15	70.08	70.00	70.20	—
1d	—	101.18	101.17	101.08	101.13	—
2d	—	72.65	72.64	72.63	72.66	—
3d	—	77.37	77.23	77.04	77.51	—
4d	—	73.58	73.57	73.58	73.52	—
5d	—	74.22	74.25	74.28	74.20	—
6d	—	62.87	62.88	62.87	62.84	—

(続きあり)

*, 副生成物1乃至4は実験3-3で単離した副生成物1乃至4を示し、CGTase2は実験4-3(b)で単離したCGTase生成物2を示している。

(その2)

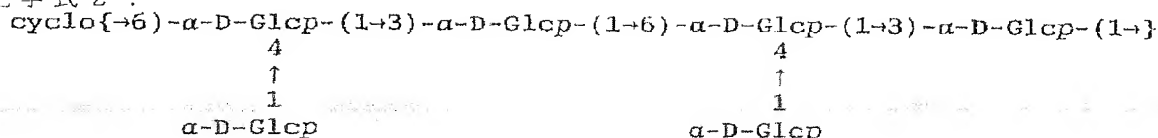
炭素番号	化学シフト (ppm)					
	環状四糖	副生成物1*	副生成物2*	副生成物3*	副生成物4*	CGTase2*
1e	—	102.14	100.59	100.50	100.54	102.34
2e	—	74.40	74.25	74.28	74.20	74.60
3e	—	75.62	75.82	75.85	75.77	75.81
4e	—	72.23	72.16	72.02	72.12	72.43
5e	—	74.10	73.10	73.08	73.05	74.33
6e	—	63.38	68.18	67.85	68.14	63.58
1f	—	—	101.84	102.17	101.79	—
2f	—	—	74.25	72.63	74.20	—
3f	—	—	75.82	82.98	75.77	—
4f	—	—	72.25	72.87	72.20	—
5f	—	—	74.50	74.28	74.45	—
6f	—	—	63.18	62.87	63.13	—
1g	—	—	—	100.50	102.11	—
2g	—	—	—	74.28	74.36	—
3g	—	—	—	75.85	75.57	—
4g	—	—	—	72.24	72.20	—
5g	—	—	—	72.99	74.06	—
6g	—	—	—	67.85	63.33	—
1h	—	—	—	102.17	—	—
2h	—	—	—	74.28	—	—
3h	—	—	—	75.92	—	—
4h	—	—	—	72.24	—	—
5h	—	—	—	74.51	—	—
6h	—	—	—	63.16	—	—

(以上)

*, 副生成物1乃至4は実験3-3で単離した副生成物1乃至4を示し、CGTase2は実験4-3(b)で単離したCGTase生成物2を示している。

以上の結果から、C G T a s e 生成物 2 を化学式 2 に示す構造を有する分岐環状四糖と特定した。

化学式 2 :



以上実験 4 - 3 (b) で特定された分岐環状四糖の分岐部分の構成糖ならびに結合様式、実験 4 - 3 (a) に示した酵素反応後の H P L C 分析結果を総合すると、実験 4 - 3 (a) の酵素反応による場合、生成する分岐環状四糖は、通常、次の特徴を示すと考えられる 10。すなわち、該分岐環状四糖は一般式 1 で表される基本構造を有し、一般式 1 における R₁乃至 R₁₂の 1 個又は 2 個以上、比較的多くの場合、R₁及び／又は R₇が、置換基を有することのある { α - D - グルコピラノシル - (1 → 4) - }_n α - D - グルコピラノシル基 (ただし、n は 0 以上の整数を意味し、R₁乃至 R₁₂における 2 個以上が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。) である。実験 4 - 4 : パチルス・サーキュランスの β - ガラクトシダーゼによるグリコシル転移

実験 4 - 4 (a) : 酵素反応

実験 3 - 2 の方法で得た環状四糖 20 g とラクトース (試薬特級、和光純薬工業株式会社製造) 20 g を 20 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 6 . 0) 93 . 3 g に溶解し、パチルス・サーキュランスの β - ガラクトシダーゼ (商品名『ビオラクタン 5』、大和化成株 20式会社製造) をラクトース 1 g あたり 3 単位加えて 40 ° C で 24 時間反応させ、その後、反応液を 20 分間煮沸して酵素を失活させた。

上記の反応液と環状四糖の水溶液とを実験 3 - 1 に示した H P L C により分析した。その結果、反応液中に、環状四糖 (保持時間約 10 分) とは保持時間の異なる新たな成分の生成が少なくとも 3 種類認められた。この 3 種類の新たに認められた成分の保持時間を、個々に付した名称及びピーク面積の相対値とともに表 5 に示す。

表 5 :

HPLCにおける保持時間 (分*)	名 称	ピーク面積**
14.0	β - ガラクトシダーゼ生成物 1	12.2%
19.7	β - ガラクトシダーゼ生成物 2	2.9%
20.3	β - ガラクトシダーゼ生成物 3	1.1%

*, いずれもおおよその値である。

**, 認められた全てのピークの面積の合計を 100 としたときの相対値。

実験 4 - 4 (b) : 反応生成物の単離と特定

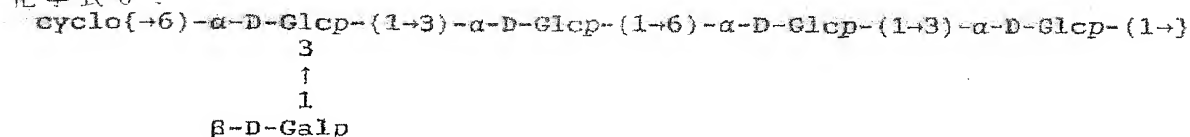
実験 4 - 4 (a) の方法で得た反応液に水酸化ナトリウム 4 . 8 g を加え、100 ° C で 1 40時間保持して還元糖を分解した。この反応液を常法により脱塩、濾過、濃縮した後、分取用液体クロマトグラフィーに供した。分取用カラムとして『Y M C - P a c k O D S - A Q R 355 - 15 A Q, S - 10 / 20 μ m, 120 A』 (株式会社ワイエムシー製造) を、移動相として精製脱イオン水を用いた。溶出液を実験 3 - 1 に記載の H P L C により分析し、β - ガラクトシダーゼ生成物 1 を純度 97 % 以上で含む画分を採取した。

上記の画分を実験 3 - 4 に示した 7 項目の分析に準じて分析した。β - ガラクトシダーゼ生成物 1 は、質量数 810 であり、実質的に非還元性の糖質であった。構成糖は D - グルコースと D - ガラクトースであり、その構成比は 4 : 1 であった。質量数を考慮すると、同生成物は D - グルコース 4 分子と D - ガラクトース 1 分子からなると考えられた。比旋光度は [α]²⁵_D + 200 ° であった。¹³C - N M R では第 10 図に示すスペクトル 50

が得られた。シグナルの帰属は、実験 4 - 5 乃至実験 4 - 7 における他の結果ならびに環状四糖についての帰属の結果とあわせて後記表 7 に示している。

以上の結果から、 β -グルコシダーゼ生成物 1 を化学式 6 に示す構造を有する分岐環状四糖と同定した。

化学式 6 :



実験 4 - 5 : アスペルギルス・ニガーの β -ガラクトシダーゼによるグリコシル転移

10

実験 4 - 5 (a) : 酵素反応

実験 3 - 2 の方法で得た環状四糖 20 g とラクトース (試薬特級、和光純薬工業株式会社製造) 20 g を 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4 . 5) 93 . 3 g に溶解し、アスペルギルス・ニガーの β -ガラクトシダーゼ (商品名『ラクターゼ Y A - O』、ヤクルト薬品工業株式会社製造) をラクトース 1 g あたり 10 単位加えて 40 °C で 24 時間反応させ、その後、反応液を 20 分間煮沸して酵素を失活させた。

上記の反応液と環状四糖の水溶液とを実験 3 - 1 に示した HPLC により分析した。その結果、反応液中に、環状四糖 (保持時間約 10 分) とは保持時間の異なる新たな成分の生成が少なくとも 3 種類認められた。この 3 種類の新たに認められた成分の保持時間を、個々に付した名称及びピーク面積の相対値とともに表 6 に示す。

20

表 6 :

HPLCにおける保持時間 (分*)	名 称	ピーク面積**
14.1	化学式 6 ***	3.3%
15.1	β -ガラクトシダーゼ生成物 4	0.7%
19.1	β -ガラクトシダーゼ生成物 5	7.1%

*, いずれもおおよその値である。

30

**, 認められた全てのピークの面積の合計を 100 としたときの相対値。

***, 保持時間により、実験 4-4(b) に示した化学式 6 で表される分岐環状オリゴ糖と同定した。

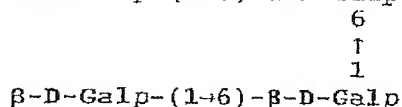
実験 4 - 5 (b) : 反応生成物の単離と同定

実験 4 - 5 (a) の方法で得た反応液に水酸化ナトリウム 4 . 8 g を加え、100 °C で 1 時間保持して還元糖を分解した。この反応液を常法により脱塩、濾過、濃縮した後、分取用液体クロマトグラフィーに供した。分取用カラムとして『YMC-Pack ODS-AQR 355-15AQ, S-10/20 μ m, 120A』 (株式会社ワイエムシー製造) を、移動相として精製脱イオン水を用いた。溶出液を実験 3 - 1 に記載の HPLC により分析し、 β -ガラクトシダーゼ生成物 4 を純度 94 % 以上で含む画分と、 β -ガラクトシダーゼ生成物 5 を純度 99 % 以上で含む画分を採取した。

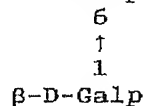
40

上記の β -ガラクトシダーゼ生成物 4 の高含有画分を実験 3 - 4 に示した 7 項目の分析に準じて分析した。 β -ガラクトシダーゼ生成物 4 は、質量数 973 であり、実質的に非還元性の糖質であった。構成糖は D-グルコースと D-ガラクトースであり、その構成比は 2 : 1 であった。質量数を考慮すると、同生成物は D-グルコース 4 分子と D-ガラクトース 2 分子からなると考えられた。メチル化分析では、2, 4-ジメチルグルコース、2, 3, 4-トリメチルグルコース、2, 4, 6-トリメチルグルコース、2, 3, 4-トリメチルガラクトース、及び 2, 3, 4, 6-テトラメチルガラクトースが、1 : 1 . 86 : 0 . 96 : 1 . 34 : 1 . 12 のモル比で確認され、これらの構成比は 1 : 2 : 1 : 50

以上の結果から、 β -グルコシダーゼ生成物 4 を化学式 8 に示す構造を有する分岐環状四糖と固定した。

$$\text{cyclo}\{\rightarrow 6)-\alpha-D-\text{GlcP}-(1 \rightarrow 3)-\alpha-D-\text{GlcP}-(1 \rightarrow 6)-\alpha-D-\text{GlcP}-(1 \rightarrow 3)-\alpha-D-\text{GlcP}-(1 \rightarrow$$


以上の結果から、 β -グルコシダーゼ生成物 5 を化学式 7 に示す構造を有する分岐環状四糖と同定した。

$$\text{cyclo}\{-6\}-\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow3)-\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow6)-\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow3)-\alpha\text{-D-Glcp}-(1\rightarrow)$$


以上実験 4-5 (b) で同定された分岐環状四糖の分岐部分の構成糖ならびに結合様式を総合すると、実験 4-5 (a) の酵素反応による場合、生成する分岐環状四糖は、通常、次の特徴を示すと考えられる。すなわち、該分岐環状四糖は一般式 1 で表される基本構造を有し、一般式 1 における R_1 乃至 R_{12} の 1 個又は 2 個以上、比較的多くの場合、 R_6 及び \diagup 又は R_{12} が、置換基を有することのある $\{\beta\text{-D-ガラクトピラノシル-}(1\rightarrow 6)\text{-}\}_n\alpha\text{-D-ガラクトピラノシル基}$ (ただし、 n は 0 以上の整数を意味し、 R_1 乃至 R_{12} における 2 個以上が当該基である場合、それぞれの当該基において n は互いに独立しているものとする。) である。

実験 4-6: α -ガラクトシダーゼによるグリコシル転移

実験 4 - 6 (a) : 酵素反応

実験 3-2 の方法で得た環状四糖 5 g とメリピオース（試薬特級、和光純薬工業株式会社製造）5 g を 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）15 g に溶解し、モルティエレーの α -ガラクトシダーゼ（商品名『メリピアーゼ』、北海道糖業株式会社製造）をメリピオース 1 g あたり 100 単位加えて 40℃ で 30 時間反応させ、その後、反応液を 20 分間煮沸して酵素を失活させた。

上記の反応液と環状四糖の水溶液とを実験 3-1 に示した H P L C により分析した。その結果、反応液中に、環状四糖（保持時間約 10 分）とは保持時間の異なる、保持時間 13.3 分の、少なくとも 1 種類の新たな成分の生成が認められた。この H P L C 分析において、全ピーク面積に対する新たに認められた成分のピーク面積の百分率は約 1.0 %であった。

実験 4-6 (b) : 反応生成物の単離と同定

実験 4-6 (a) の方法で得た反応液を常法により脱塩、濾過、濃縮した後、実験 4-5 (b) の方法にしたがって分取用液体クロマトグラフィーに供した。溶出液を実験 3-1

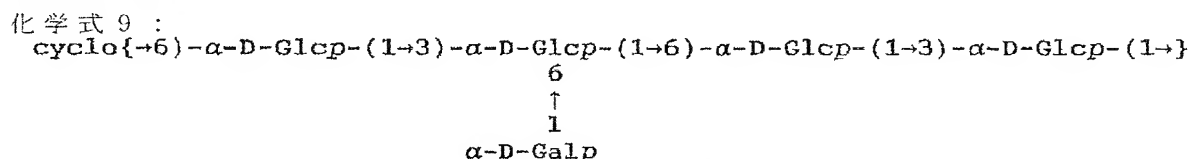
に記載の H P L C により分析し、上記で確認した α -ガラクトシダーゼ生成物を純度 98 % 以上で含む画分を採取した。

上記の α -ガラクトシダーゼ生成物の高含有画分を実験 3-4 に示した 7 項目の分析に準じて分析した。 β -ガラクトシダーゼ生成物 4 は、質量数 810 であり、実質的に非還元性の糖質であった。構成糖は D-グルコースと D-ガラクトースであり、その構成比は 4 : 1 であった。質量数を考慮すると、同生成物は D-グルコース 4 分子と D-ガラクトース 1 分子からなると考えられた。メチル化分析では、2, 4-ジメチルグルコース、2, 3, 4-トリメチルグルコース、2, 4, 6-トリメチルグルコース、及び 2, 3, 4, 6-テトラメチルガラクトースが、1 : 2.09 : 1.02 : 1.02 のモル比で確認され、これらの構成比は 1 : 2 : 1 : 1 と考えられた。 ^{13}C -NMR では第 13 図に示す

10

スペクトルが得られた。シグナルの帰属は、実験 4-5 乃至実験 4-7 における他の結果ならびに環状四糖についての帰属の結果とあわせて後記表 7 に示している。

以上の結果から、本実験で得た α -グルコシダーゼ生成物を化学式 9 に示す構造を有する分岐環状四糖と同定した。



実験 4-7 : リゾチームによるグリコシル転移

20

実験 4-7 (a) : 酵素反応

実験 3-2 の方法で得た環状四糖 20 g とキチンオリゴ糖 (商品名『N A - C O S - Y』、焼津水産化学工業株式会社製造、重合度 2 乃至 6 のキチンオリゴ糖を乾燥重量換算で約 55 % 含む) 10 g を 50 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 4.5) 45 g に溶解し、卵白リゾチーム (生化学工業株式会社製造) を 2.8 g 加えて 60 °C で 9 日間反応させ、その後、反応液を 20 分間煮沸して酵素を失活させた。

上記の反応液を、H P L C の前処理として、遠心分離し、その上清を限外濾過膜 (商品名『S E P - 0 0 1 3』、旭化成工業株式会社製造) を用いて濾過して除タンパクした後、常法により脱塩した。この前処理液と環状四糖の水溶液とを実験 3-1 に示した H P L C により分析した。その結果、反応液中に、環状四糖 (保持時間約 10 分) とは保持時間の異なる、保持時間 36.6 分の、少なくとも 1 種の新たな成分の生成が認められた。この H P L C 分析において、全ピーク面積に対する新たに認められた成分のピーク面積の百分率は約 7.3 % であった。

30

実験 4-7 (b) : 反応生成物の単離と同定

実験 4-7 (a) の方法で得た反応液を、実験 4-7 (a) に記載の H P L C の前処理と同様に処理した後、実験 4-5 (b) の方法にしたがって分取用液体クロマトグラフィーに供した。溶出液を実験 3-1 に記載の H P L C により分析し、上記で確認したリゾチーム生成物を純度 99 % 以上で含む画分を採取した。

上記のリゾチーム生成物の高含有画分を実験 3-4 に示した 7 項目の分析に準じて分析した。リゾチーム生成物は、質量数 851 であり、実質的に非還元性の糖質であった。構成糖は D-グルコースと N-アセチル-D-グルコサミン (N-アセチル-D-キトサミン) であり、その構成比は 4 : 1 であった。質量数を考慮すると、同生成物は D-グルコース 4 分子と N-アセチル-D-グルコサミン 1 分子からなると考えられた。メチル化分析では、2, 4-ジメチルグルコース、2, 3, 4-トリメチルグルコース、及び 2, 4, 6-トリメチルグルコースが、1.02 : 1 : 1.67 のモル比で確認され、これらの構成比は 1 : 1 : 2 と考えられた。比旋光度は $[\alpha]^{25}_{\text{D}} + 246^{\circ}$ であった。 ^{13}C -NMR では第 14 図に示すスペクトルが得られた。シグナルの帰属を、上記実験 4-4 乃至 4-6 で述べた他の結果ならびに環状四糖についての帰属の結果とあわせて表 7 に示す

40

表 7 :

50

(その1)

炭素番号	化学シフト (ppm)					
	環状四糖	β -Gal1*	β -Gal4*	β -Gal5*	α -Gal*	Lys*
1a	99.34	98.96	99.39	99.36	99.25	99.47
2a	74.28	73.67	74.27	74.24	74.28	72.48
3a	75.45	83.59	75.45	75.42	75.44	84.53
4a	73.35	73.11	73.28	73.24	73.42	74.03
5a	72.78	72.44	72.76	72.76	72.60	72.57
6a	70.22	70.06	70.38	70.35	70.10	70.18
1b	101.20	101.04	101.22	101.27	101.07	101.13
2b	72.64	72.60	72.65	72.62	72.60	72.69
3b	77.31	77.29	77.37	77.36	77.35	77.22
4b	73.62	73.62	73.34	73.31	73.61	73.65
5b	74.28	74.21	73.46	73.45	72.79	74.23
6b	62.88	62.86	70.66	70.59	67.94	62.84
1c	—	99.21	99.39	99.36	99.25	99.31
2c	—	74.26	74.27	74.24	74.28	74.28
3c	—	75.41	75.45	75.42	75.44	75.44
4c	—	73.34	73.22	73.24	73.35	73.35
5c	—	72.70	72.76	72.73	72.60	72.77
6c	—	70.06	70.22	70.20	70.10	70.18

(続きあり)

*, β -Gal1は実験4-4(b)で単離した β -ガラクトシダーゼ生成物1を、 β -Gal4及び5は実験4-5(b)で単離した β -ガラクトシダーゼ生成物4及び5を、 α -Galは実験4-6(b)で単離した α -ガラクトシダーゼ生成物を、Lysは実験4-7(b)で単離したリゾチーム生成物をそれぞれ示している。

10

(その2)

炭素番号	化学シフト (ppm)					
	環状四糖	β -Gal1*	β -Gal4*	β -Gal5*	α -Gal*	Lys*
1d	—	100.95	101.22	101.21	100.96	101.13
2d	—	72.54	72.57	72.54	72.60	72.63
3d	—	77.03	77.24	77.21	77.18	77.22
4d	—	73.53	73.34	73.31	73.61	73.60
5d	—	74.21	74.27	74.24	74.22	74.23
6d	—	62.86	62.88	62.86	62.87	62.84
1e	—	107.57	105.93	106.01	100.55	—
2e	—	74.08	73.42	73.58	71.20	—
3e	—	75.18	75.26	75.42	72.29	—
4e	—	71.46	71.37	71.34	71.97	—
5e	—	78.02	76.57	77.83	73.75	—
6e	—	64.18	71.60	63.70	63.87	—
1f	—	—	106.02	—	—	104.66
2f	—	—	73.62	—	—	58.43
3f	—	—	75.45	—	—	76.38
4c	—	—	71.31	—	—	71.86
5f	—	—	77.87	—	—	78.52
6f	—	—	63.67	—	—	63.38
CO	—	—	—	—	—	177.58
CH ₃	—	—	—	—	—	24.92

(以上)

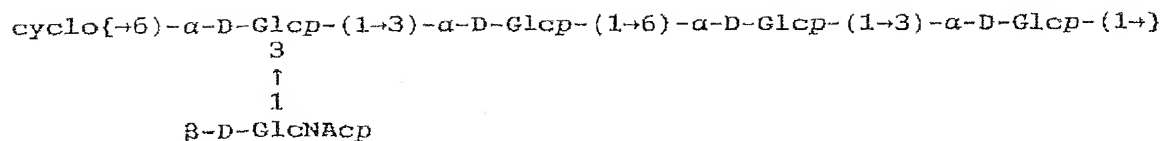
*, β -Gal1は実験4-4(b)で単離した β -ガラクトシダーゼ生成物1を、 β -Gal4及び5は実験4-5(b)で単離した β -ガラクトシダーゼ生成物4及び5を、 α -Galは実験4-6(b)で単離した α -ガラクトシダーゼ生成物を、Lysは実験4-7(b)で単離したリゾチーム生成物をそれぞれ示している。

以上の結果から、本実験で得たリゾチーム生成物を化学式10に示す構造を有する分岐環状四糖と同定した。

化学式10:

30

40



実験 5 : 分岐環状四糖の結晶

実験 3 - 3 の方法で得た副生成物 1 (化学式 1 で表される分岐環状四糖。以下、化学式番号をもって、本発明による個々の分岐環状四糖を示すものとする。) 及び副生成物 2 (化学式 3)、実験 4 - 3 (b) の方法で得た C G T a s e 生成物 2 (化学式 2)、実験 4 - 4 (b) の方法で得た β -ガラクトシダーゼ生成物 1 (化学式 6)、実験 4 - 5 (b) の方法で得た β -ガラクトシダーゼ生成物 5 (化学式 7) のそれぞれの高含有画分を濃縮したところ、いずれも結晶の析出が認められた。十分に結晶を析出させた後、個々に、常法により分蜜して結晶を採取した。採取した結晶を常温で乾燥させ、以上 5 種類の分岐環状四糖の結晶粉末を得た。実験 3 - 1 に示した H P L C で分析したところ、化学式 1、化学式 2、化学式 6 及び化学式 7 の結晶は純度 99% 以上、化学式 3 の結晶の純度は 98% 以上であった。

上記で得た結晶粉末を結晶の形状、X 線回折、色、水分、融点、熱特性の全て又は一部についてそれぞれ調べた。結晶の形状は光学顕微鏡により観察した。X 線回折は、通常粉末 X 線回折法により調べた。水分はカルフィッシャー法により、融点は市販の融点測定装置 (商品名『M P - 2 1 型』、ヤマト科学株式会社製造) により測定した。熱特性は、市販のデジタル熱分析計 (商品名『T G / D T A 2 2 0 型』、セイコー電子工業株式会社製造) を用いて熱重量分析を行うことにより調べた。

化学式 1、化学式 2 及び化学式 3 を顕微鏡で観察したところ、化学式 1 は柱状、化学式 2 は針状、化学式 3 は柱状であった。

上記の全ての結晶の X 線回折図形を、それぞれ、第 15 図乃至第 19 図に示す。X 線回折において認められた主たる回折角 (2θ) と、色、水分、融点について調べた結果とともに表 8 にまとめて示す。

表 8 :

	主たる回折角 (2θ)	色	水分	1 分子あたり の結晶水の数*	融 点
化学式 1	8.1°, 12.2°, 14.2°, 15.4°	白	11.1%	5乃至6	270°C 付近で分解 し、測定できず
化学式 2	5.6°, 8.8°, 16.9°, 21.9°	白	17.5%	11乃至12	280°C 付近で分解 し、測定できず
化学式 3	7.9°, 12.1°, 17.9°, 20.2°	白	15.8%	10乃至11	275°C 付近で分解 し、測定できず
化学式 6	11.0°, 12.3°, 12.8°, 24.9°	白	17.1%	9乃至10	93°C
化学式 7	8.7°, 13.0°, 21.7°, 26.1°	白	11.0%	5乃至6	245°C 付近で分解 し、測定できず

*, 水分の測定値をもとに求めた。

上記の全ての結晶の熱特性についての分析結果を、それぞれ、第 20 図乃至第 24 図に示す。第 20 図に示すとおり、化学式 1 は、150°C までの上昇により 4 分子の水に相当する重量減少が認められ、さらに、300°C 前後からは化学式 1 自体の熱分解と考えられる

重量減少が観察された。このことから、化学式 1 の 5 乃至 6 含水結晶は、常圧において温度を 150℃まで上昇させると、1 分子あたり 1 乃至 2 分子の結晶水を含む結晶に変換され则认为られる。

第 2 1 図に示すとおり、化学式 2 は、昇温に伴って、約 150℃までに 6 乃至 7 分子の水に相当する重量減少が認められた。さらに、300℃前後からは化学式 2 自体の熱分解と考えられる重量減少が観察された。このことから、化学式 2 の 1 1 乃至 1 2 含水結晶は、常圧において温度を 150℃まで上昇させると、1 分子あたり 4 乃至 5 分子の結晶水を含む結晶に変換され则认为られる。

第 2 2 図に示すとおり、化学式 3 は、昇温に伴って、約 110℃までに 6 乃至 7 分子の水に相当する重量減少が認められ、さらに、300℃前後からは化学式 3 自体の熱分解と考えられる重量減少が観察された。このことから、化学式 3 の 1 0 乃至 1 1 含水結晶は、常圧において温度を 110℃まで上昇させると、1 分子あたり 3 乃至 4 分子の結晶水を含む結晶に変換され则认为られる。

第 2 3 図に示すとおり、化学式 6 は、昇温に伴って、約 120℃までに 7 乃至 8 分子の水に相当する重量減少が認められ、さらに、300℃前後からは化学式 6 自体の熱分解と考えられる重量減少が観察された。このことから、化学式 6 の 9 乃至 1 0 含水結晶は、常圧において温度を 120℃まで上昇させると、1 分子あたり 1 乃至 2 分子の結晶水を含む結晶に変換され则认为られる。

第 2 4 図に示すとおり、化学式 7 は、昇温に伴って、約 130℃までに 5 乃至 6 分子の水に相当する重量減少が認められ、さらに、300℃前後からは化学式 7 自体の熱分解と考えられる重量減少が観察された。このことから、化学式 7 の 5 乃至 6 含水結晶は、常圧において温度を 130℃まで上昇させると、1 分子あたり 0 乃至 1 分子の結晶水を含む結晶に変換され则认为られる。

実施例 A-1：化学式 1 及び 2 で表される分岐環状四糖含有シラップ

実験 3-2 の方法で得た環状四糖 1 重量部と α -シクロデキストリン（株式会社林原生物化学研究所製造）1 重量部を 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.5）3 重量部に溶解し、パチルス・ステアロサーモフィラスの CGTase（株式会社林原生物化学研究所製造）を α -シクロデキストリン 1 g あたり 10 単位加えて 50℃で 24 時間反応させ、その後、反応液を 20 分間煮沸して酵素を失活させた。

上記の反応液に 50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 4.5）350 g を加え、さらに、グルコアミラーゼ（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社販売）を α -シクロデキストリンの始発添加量 1 g あたり 200 単位加え、40℃で 4 時間反応させ、その後、反応液を 20 分間煮沸して酵素を失活させた。

上記の酵素失活後の反応液を膜濾過した後、カチオン交換樹脂（商品名『ダイヤイオン PK 218』、三菱化学工業株式会社製造）とアニオン交換樹脂（商品名『IRA 411』、オルガノ株式会社製造）を用いて脱塩し、濃縮した。この濃縮液を実験 3-2 に示したクロマト分離の条件にしたがって分画し、各画分を実験 3-1 に示した HPLC で分析し、化学式 1 及び化学式 2 で表される分岐環状四糖をそれぞれ純度 85% 以上で含む画分を採取した。採取した画分を濃縮し、固形物濃度約 50%（w/w）のシラップを得た。

本品は、得られたそのままの形態で、あるいは、さらに濃縮や、乾燥、結晶化、粉碎等の処理を施した上で、非晶質粉末、含蜜結晶、ブロックなどの形態で、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。

実施例 A-2：化学式 3 で表される分岐環状四糖含有シラップ

実験 3-2 の方法で得た環状四糖 2 重量部、パノース（株式会社林原生物化学研究所製造）1 重量部、及び 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）7 重量部を混合、溶解し、実験 2-2 の方法で得た精製 α -イソマルトシル転移酵素をパノース 1 g あたり 30 単位加えて、30℃で 24 時間反応させ、その後、反応液を 20 分間煮沸して酵素を失活させた。

この酵素失活後の反応液を膜濾過した後、カチオン交換樹脂（商品名『ダイヤイオン PK 218』、三菱化学工業株式会社製造）とアニオン交換樹脂（商品名『IRA 411』、

オルガノ株式会社製造)を用いて脱塩し、濃縮した。この濃縮液を実験3-2に示したクロマト分離の条件にしたがって分画し、各画分を実験3-1に示したHPLCで分析し、化学式3で表される分岐環状四糖を純度80%以上で含む画分を採取した。採取した画分を濃縮し、固形物濃度約40%(w/w)のシラップを得た。

本品は、得られたそのままの形態で、あるいは、さらに濃縮や、乾燥、結晶化、粉碎等の処理を施した上で、非晶質粉末、含蜜結晶、ブロックなどの形態で、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。

実施例A-3: 化学式6で表される分岐環状四糖含有シラップ

実験3-2の方法で得た環状四糖2重量部、ラクトース2重量部、及び20mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH6.0)9重量部を混合、溶解し、パチルス・サーキュランスのβ-ガラクトシダーゼ(商品名『ピオラクタン5』、大和化成株式会社製造)をラクトース1gあたり3単位加えて40℃で24時間反応させ、その後、反応液を20分間煮沸して酵素を失活させた。

この酵素失活後の反応液に水酸化ナトリウム0.5重量部加え、100℃で1時間保持して還元糖を分解した。この反応液を常法により脱塩、濾過、濃縮した後、分取用液体クロマトグラフィーに供した。分取用カラムとして『YMC-Pack ODS-AQR355-15AQ, S-10/20μm, 120A』(株式会社ワイエムシー製造)を、移動相として精製脱イオン水を用いた。溶出液を実験3-1に記載のHPLCにより分析し、化学式6で表される分岐環状四糖を純度85%以上で含む画分を採取した。採取した画分を濃縮し、固形物濃度約40%(w/w)のシラップを得た。

本品は、得られたそのままの形態で、あるいは、さらに濃縮や、乾燥、結晶化、粉碎等の処理を施した上で、非晶質粉末、含蜜結晶、ブロックなどの形態で、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。

実施例A-4: 化学式7で表される分岐環状四糖含有シラップ

実験3-2の方法で得た環状四糖2重量部、ラクトース2重量部、及び20mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.5)9重量部に溶解し、アスペルギルス・ニガーのβ-ガラクトシダーゼ(商品名『ラクターゼYA-O』、ヤクルト薬品工業株式会社製造)をラクトース1gあたり10単位加えて40℃で24時間反応させ、その後、反応液を20分間煮沸して酵素を失活させた。

この酵素失活後の反応液に水酸化ナトリウム0.5重量部を加え、100℃で1時間保持して還元糖を分解した。この反応液を常法により脱塩、濾過、濃縮した後、分取用液体クロマトグラフィーに供した。分取用カラムとして『YMC-Pack ODS-AQR355-15AQ, S-10/20μm, 120A』(株式会社ワイエムシー製造)を、移動相として精製脱イオン水を用いた。溶出液を実験3-1に記載のHPLCにより分析し、化学式7で表される分岐環状四糖を純度85%以上で含む画分を採取した。採取した画分を濃縮し、固形物濃度約45%(w/w)のシラップを得た。

本品は、得られたそのままの形態で、あるいは、さらに濃縮や、乾燥、結晶化、粉碎等の処理を施した上で、非晶質粉末、含蜜結晶、ブロックなどの形態で、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。

実施例A-5: 化学式1及び2で表される分岐環状四糖の結晶

実施例A-1にしたがって、CGTase反応に続いてグルコアミラーゼ反応を行い、酵素失活させた反応液を、実施例A-1と同様にクロマト分離に供した。溶出液を実験3-1に記載のHPLCにより分析し、化学式1及び2で表される分岐環状四糖を純度97%以上で含む画分をそれぞれ採取した。採取した画分を濃縮後、それぞれに、実験5で得た化学式1及び2の結晶を種晶として加え、結晶を十分に析出させた。常法により分蜜し、結晶を採取し、採取した結晶を常温で乾燥させて、化学式1及び化学式2で表される分岐環状四糖それぞれの結晶(いずれも純度99%以上)を得た。実験5に示した水分測定により、化学式1の結晶が5乃至6含水であり、化学式2の結晶が11乃至12含水であることを確認した。

本品は、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利

用できる。

実施例 A-6 : 化学式 3 で表される分岐環状四糖の結晶

実施例 A-2 にしたがって、 β -ガラクトシダーゼ反応を行い、酵素失活させた反応液を、実施例 A-2 と同様にクロマト分離に供した。溶出液を実験 3-1 に記載の HPLC により分析し、化学式 3 で表される分岐環状四糖を純度 97% 以上で含む画分を採取した。採取した画分を濃縮後、この濃縮液に、実験 5 で得た化学式 3 の結晶を種晶として加え、結晶を十分に析出させた。常法により分蜜し、結晶を採取し、採取した結晶を常温で乾燥させて、化学式 3 で表される分岐環状四糖の結晶（純度 99% 以上）を得た。実験 5 に示した水分測定によりこの結晶が 10 乃至 11 含水であることを確認した。

本品は、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。 10

実施例 A-7 : 化学式 6 で表される分岐環状四糖の結晶

実施例 A-3 にしたがって、 α -イソマルトシル転移酵素による反応を行い、酵素失活させた反応液を、実施例 A-3 と同様にクロマト分離に供した。溶出液を実験 3-1 に記載の HPLC により分析し、化学式 6 で表される分岐環状四糖を純度 96% 以上で含む画分を採取した。採取した画分を濃縮後、この濃縮液に、実験 5 で得た化学式 6 の結晶を種晶として加え、結晶を十分に析出させた。常法により分蜜し、結晶を採取し、採取した結晶を常温で乾燥させて、化学式 6 で表される分岐環状四糖の結晶（純度 99% 以上）を得た。実験 5 に示した水分測定によりこの結晶が 9 乃至 10 含水であることを確認した。

本品は、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。 20

実施例 A-8 : 化学式 7 で表される分岐環状四糖の結晶

実施例 A-4 にしたがって、 β -ガラクトシダーゼによる反応を行い、酵素失活させた反応液を、実施例 A-4 と同様にクロマト分離に供した。溶出液を実験 3-1 に記載の HPLC により分析し、化学式 7 で表される分岐環状四糖を純度 97% 以上で含む画分を採取した。採取した画分を濃縮後、この濃縮液に、実験 5 で得た化学式 7 の結晶を種晶として加え、結晶を十分に析出させた。常法により分蜜し、結晶を採取し、採取した結晶を常温で乾燥させて、化学式 7 で表される分岐環状四糖の結晶（純度 99% 以上）を得た。実験 5 に示した水分測定によりこの結晶が 5 乃至 6 含水であることを確認した。

本品は、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。 30

実施例 A-9 : 分岐環状四糖含有シラップ

3.7 kg の澱粉部分分解物（商品名『パインデックス #100』、松谷化学工業株式会社製造）を、35 L の 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH 6.0）に溶解し、この溶液に、実験 2-1 の方法で得た酵素剤を、環状四糖生成活性として 17,500 単位相当加え、30℃で2日間保持して反応させ、その後反応液を20分間煮沸して酵素を失活させた。この反応液を45℃に調整した後、11 g（137,500 単位）の α -アミラーゼ剤（商品名『ネオスピターゼ PK2』、ナガセ生化学工業株式会社製造）及び44 g（140,800 単位）のグルコアミラーゼ剤（商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社製造）を加え、pH 6.0 に調整した後、45℃で1日間保持して反応させ、その後反応液を20分間煮沸して酵素を失活させた。この反応液を常法により濾過し、濾液を逆浸透膜を用いて固形物濃度約 16%（w/w）にまで濃縮した。この濃縮液を常法にしたがって脱色、脱塩、濾過、濃縮して、固形物当り分岐環状四糖 12%、環状四糖 44%、グルコース 25%、及びオリゴ糖 19% からなる固形分を 3.5 kg 含むシラップを約 6.1 kg 得た。

本品は、工業的に安価かつ容易に製造できる難晶出性のシラップであり、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。

実施例 A-10 : 分岐環状四糖含有シラップ

実験 3-1 の方法で得た糖液 6.1 kg を、イオン交換樹脂（商品名『アンバーライト C R-1310』、Na 型、オルガノ製造、樹脂量約 225 L）を充填したカラム（内径 1 50

3. 5 c m × 長さ 1 6 0 c m のカラムを 1 0 本直列に連結) を用いてクロマト分離に供した。移動相には水 (流速 4 5 L / h) を用い、カラム温度は 6 0 ℃ とした。カラムからの溶出液を分画し、各画分の糖組成を実験 3 - 1 に示した H P L C により求めた。環状四糖を比較的多く含む画分を合一し、1 5 3 0 g の固形物を含む糖液を得た。上記と同じ条件による H P L C で分析し、ピーク面積に基づいて計算したところ、この合一した画分 (環状四糖高含有画分) は、全糖質当り、環状四糖を 7 9 . 8 % 、イソマルトースを 6 . 1 % の割合で含むものであった。

環状四糖高含有画分の固形物として 1 , 3 1 0 g 相当を、p H 5 . 0 、5 0 ℃ に調整した後、 α -グルコシダーゼ (商品名『トランスグルコシダーゼ L 「アマノ」』、天野製薬株式会社製造) を固形物 1 g 当り 1 0 0 0 単位とグルコアミラーゼ (商品名『グルコチーム』、ナガセ生化学工業株式会社販売) を固形物 1 g 当り 6 0 単位添加して 2 0 時間処理した。この処理後の液を、濾過により不溶物を除去した後、カチオン交換樹脂 (商品名『ダイヤイオン P K 2 1 8』、三菱化学工業株式会社製造) とアニオン交換樹脂 (商品名『I R A 4 1 1』、オルガノ株式会社製造) を用いて脱塩し、濃縮した。この濃縮液を上記のクロマト分離の条件にしたがって分画し、環状四糖の純度が 9 7 % 以上の画分を採取した。採取した画分を常法にしたがって脱色、脱塩、濾過、濃縮し、固形物約 1 , 2 6 0 g を含む糖液を得た。この糖液を、固形物濃度約 5 0 % (w / w) に調整した後、円筒状のプラスチック容器に入れ、穏やかに回転させながら、温度を 6 5 ℃ から 2 0 ℃ にまで約 2 0 時間かけて降下させて結晶を析出させ、常法にしたがって分密し、得られる母液を精製・濃縮して、固形分当り分岐環状四糖 4 % 、環状四糖 9 4 % 、グルコース 1 % 、及びその他 20 の糖質 1 % からなる固形物濃度約 4 5 % のシラップを得た。

本品は、工業的に安価かつ容易に製造できる難晶出性のシラップであり、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。

実施例 A - 1 1 : 分岐環状四糖含有シラップ

実施例 A - 9 で得た分岐環状四糖含有シラップ (4 0 0 g) を常法に従って、アルカリ展開したラネーニッケル (商品名『N 1 5 4』、日揮化学社製) を固形物グラム当たり 0 . 1 グラム加えオートクレーブにいれ、水素圧を 1 0 0 k g / c m ² に保ち、1 0 0 ℃ にて 4 時間攪拌して、続いて 1 2 0 ℃ にて 2 時間攪拌して水素添加を行った。放冷後、オートクレーブから水素添加物を取り出し、厚さ約 1 c m の活性炭層に通液することでラネーニッケルを濾過除去し、得られる濾液を、常法に従って、活性炭で脱色し、H 形及び O H 形 30 イオン交換樹脂により脱塩し、精製し、更に、濃度約 4 0 % に濃縮し、固形物当り分岐環状四糖 1 2 % 、環状四糖 4 4 % 、ソルビトール 2 5 % 、及びその他の糖質 1 9 % からなる実質的に非還元性で難晶出性のシラップを得た。

本品は、工業的に安価かつ容易に製造できるシラップであり、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。

実施例 A - 1 2 : 分岐環状四糖含有シラップ

実施例 A - 9 で得た分岐環状四糖含有シラップ (4 0 0 g) を実施例 A - 1 0 で得た分岐環状四糖含有シラップ (4 0 0 g) で置き換えた以外は実施例 A - 1 1 と同様に処理して、固形物当り分岐環状四糖 4 % 、環状四糖 9 4 % 、ソルビトール 1 % 、及びその他の糖質 1 % からなる固形物濃度約 5 5 % の実質的に非還元性で難晶出性のシラップを得た。 40

本品は、工業的に安価かつ容易に製造できるシラップであり、飲食品、化粧品、医薬品などの諸種の分野の製品に配合する素材として有利に利用できる。

実施例 B - 1 : 甘味料

実施例 A - 5 の方法で得た、化学式 1 で表される分岐環状四糖の 5 乃至 6 含水結晶 0 . 8 重量部に、トレハロース含水結晶 (株式会社林原商事販売、登録商標『トレハ』) 0 . 2 重量部、 α -グリコシルステビオシド (東洋精糖株式会社販売、商品名『 α G スイート』) 0 . 0 1 重量部、および L - アスパルチル - L - フェニルアラニンメチルエステル (商品名『アスパルテム』) 0 . 0 1 重量部を均一に混合し、顆粒成形機にかけて顆粒状甘味料を得た。本品は、甘味の質が優れ、蔗糖の約 2 倍の甘味度を有している。本品のカロリーは、分岐環状四糖が難消化性、難発酵性で実質的に無カロリーであることから、甘味 50

度当たり蔗糖の約 10 分の 1 である。しかも、本品は、室温保存下、変質劣化の懸念が無く、安定である。従って、本品は、高品質の低カロリー、低う蝕性甘味料として好適である。

実施例 B-2 : ハードキャンディー

実施例 A-3 の方法で得た、化学式 6 で表される分岐環状四糖含有シラップ 50 重量部と、固形物濃度約 55 % (w/w) の蔗糖溶液 100 重量部を加熱しつつ混合し、次いで減圧下で水分 2 % 未満になるまで加熱濃縮し、これにクエン酸 0.6 重量部および適量のレモン香料と着色料とを混和し、常法に従って成形し、製品を得た。本品は歯切れ、呈味、風味とも良好で、蔗糖の晶出も起こさず、吸湿性少なく、ダレも起こさない安定で高品質のハードキャンディーである。

10

実施例 B-3 : 乳酸菌飲料

実施例 A-4 の方法で得た、化学式 7 で表される分岐環状四糖含有シラップ 50 重量部と、脱脂粉乳 17.5 重量部、及びラクトスクロース高含有粉末（株式会社林原商事販売、登録商標『乳果オリゴ』）50 重量部を水 1,150 重量部に溶解し、65℃で30分間殺菌し、40℃に冷却後、これに、常法に従って、乳酸菌のスターターを30重量部植菌し、37℃で8時間培養して乳酸菌飲料を得た。本品は、風味良好で、オリゴ糖、環状四糖を含有し、乳酸菌を安定に保つだけでなく、ビフィズス菌増殖促進作用、整腸作用を有する乳酸菌飲料として好適である。

実施例 B-4 : 練歯磨

実施例 A-1 の方法で得た、化学式 1 で表される分岐環状四糖含有シラップを固形物濃度約 30 % (w/w) に調整した。このシラップ 15 重量部と第二リン酸カルシウム 4.5 重量部、ラウリル硫酸ナトリウム 1.5 重量部、グリセリン 2.5 重量部、ポオキシエチレンソルピタンラウレート 0.5 重量部、サッカリン 0.02 重量部および防腐剤 0.05 重量部を水 13 重量部と混合して練歯磨を得た。本品は、界面活性剤の洗浄力を落とすことなく、嫌味を改良し、使用後感も良好である。

20

実施例 B-5 : 浴用剤

実施例 A-5 の方法で得た、化学式 2 で表される分岐環状四糖の 11 乃至 12 含水結晶 10 重量部に対してユズの皮ジュース 1 重量部の割合で混合し、乾燥させた後、粉末化して、ユズの皮エキスを含有粉末を得た。本粉末 5 重量部に、焼塩 90 重量部、トレハロース含水結晶 2 重量部、無水ケイ酸 1 重量部および α -グルコシルヘスペリジン（株式会社林原販売、商品名 α Gヘスペリジン）0.5 重量部を混合して浴用剤を得た。本品は、上品な香りを穏やかに呈し、皮膚の保湿性に優れた浴用剤である。

30

実施例 B-6 : 化粧用クリーム

モノステアリン酸ポリオキシエチレングリコール 2 重量部、自己乳化型モノステアリン酸グリセリン 5 重量部、実施例 A-6 の方法で得た、化学式 3 で表される分岐環状四糖の 10 乃至 11 含水結晶 2 重量部、 α -グルコシルルチン（株式会社林原販売、商品名 α Gルチン）1 重量部、流動パラフィン 1 重量部、トリオクタン酸グリセリン 10 重量部および防腐剤の適量を常法に従って加熱溶解し、これに L-乳酸 2 重量部、1,3-ブチレングリコール 5 重量部および精製水 66 重量部を加え、ホモゲナイザーにかけ乳化し、更に香料の適量を加えて攪拌混合し、化粧用クリームを製造した。本品は、抗酸化性を有し、安定性が高く、高品質の日焼け止め、美肌剤、色白剤などとして有利に利用できる。

40

実施例 B-7 : 錠剤

実施例 A-7 の方法で得た、化学式 6 で表される分岐環状四糖の 9 乃至 10 含水結晶 14 重量部と、アスピリン 50 重量部、及びコーンスターチ 4 重量部を十分に混合した後、常法に従って打錠機により打錠して厚さ 5.25 mm、1錠 680 mg の錠剤を製造した。本品は、分岐環状四糖の賦形性を利用したもので、吸湿性が極めて低く、物理的強度も充分にあり、しかも水中での崩壊はきわめて良好である。

産業上の利用の可能性

以上説明したとおり、本発明は、本発明者等が先に見出した新規酵素、 α -イソマルトシル転移酵素と α -イソマルトシルグルコ糖質生成酵素とを澱粉部分分解物に作用させてた

50

とき、環状四糖とともに、環状四糖のグリコシル誘導体が副生成すること、ならびに、環状四糖に上記の両酵素やシクロマルトデキストリングルカノトランスフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、リゾチームなどの糖質関連酵素を作用させることによって、極めて多岐にわたるグリコシル誘導体が見出された、本発明者等による全く独白の知見に基づくものである。本発明が提供するグリコシル誘導体、すなわち、分岐環状四糖は、物質の包接能や難消化性など環状四糖の本来の性質を有している。また、本発明の分岐環状四糖を用いて、その物性や機能についての解析を進めることにより、環状四糖の新たな用途開発や、環状四糖の性質・機能の改良につながる重要な知見が得られるといえる。

10

この発明は、斯くも顕著な作用効果を奏する発明であり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo

<120> Branched cyclic-tetrasaccharides, their preparations and uses

<130> 2

<160> W0889

10

<210> 1

<211> 3282

<212> DNA

<213> *Bacillus globisporus*

<220>

<221> CDS

20

<222> (1)...(3282)

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)...(87)

<400> 1

atg tat gta agg aat cia aca ggt tca ttc cga ttt tct ctc tct ttt	48	30
Met Tyr Val Arg Asn Leu Thr Gly Ser Phe Arg Phe Ser Leu Ser Phe		
1 5 10 15		
tig ctc tgt ttc tgt ctc ttc gtc ccc tct att tat gcc att gal ggt	96	
Leu Leu Cys Phe Cys Leu Phe Val Pro Ser Ile Tyr Ala Ile Asp Gly		
20 25 30		
gtt tat cat gcg cca tac gga atc gat gat ctg tac gag att cag gcg	144	
Val Tyr His Ala Pro Tyr Gly Ile Asp Asp Leu Tyr Glu Ile Gln Ala		
35 40 45		
acg gag cgg agt cca aga gat ccc gtt gca ggc gat act gtg tat atc	192	40
Thr Glu Arg Ser Pro Arg Asp Pro Val Ala Gly Asp Thr Val Tyr Ile		
50 55 60		

aag ala aca acg tgg ccc att gaa tca gga caa acg gct tgg gtg acc	240
Lys Ile Thr Thr Trp Pro Ile Glu Ser Gly Gln Thr Ala Trp Val Thr	
65 70 75 80	
tgg acg aaa aac ggt gtc aat caa gct gct gtc gga gca gca tlc aaa	288
Trp Thr Lys Asn Gly Val Asn Gln Ala Ala Val Gly Ala Ala Phe Lys	
85 90 95	
tac aac agc ggc aac aac act tac tgg gaa gcg aac ctt ggc act tit	336
Tyr Asn Ser Gly Asn Asn Thr Tyr Trp Glu Ala Asn Leu Gly Thr Phe	
100 105 110	10
gca aaa ggg gac glg atc agt tat acc gtt cat ggc aac aag gat ggc	384
Ala Lys Gly Asp Val Ile Ser Tyr Thr Val His Gly Asn Lys Asp Gly	
115 120 125	
gcg aat gag aag gtt atc ggt cct tit act tit acc gta acg gga tgg	432
Ala Asn Glu Lys Val Ile Gly Pro Phe Thr Phe Thr Val Thr Gly Trp	
130 135 140	
gaa tcc gtt agc agt atc agc tct att acg gat aat acg aac cgt gtt	480
Glu Ser Val Ser Ser Ile Ser Ser Ile Thr Asp Asn Thr Asn Arg Val	20
145 150 155 160	
glg ctg aat gcg glg ccg aat aca ggc aca ttg aag cca aag atc aac	528
Val Leu Asn Ala Val Pro Asn Thr Gly Thr Leu Lys Pro Lys Ile Asn	
165 170 175	
ctt tcc tit acg gcg gat gat glc etc cgc gta cag gtt tct cca acc	576
Leu Ser Phe Thr Ala Asp Asp Val Leu Arg Val Gln Val Ser Pro Thr	
180 185 190	
gga aca gga acg tla agc agt gga ctt agt aat tac aca gtt tca gat	624
Gly Thr Gly Thr Leu Ser Ser Gly Leu Ser Asn Tyr Thr Val Ser Asp	30
195 200 205	
acc gcc tca acc act tgg ctt aca act tcc aag ctg aag gtg aag gtg	672
Thr Ala Ser Thr Thr Trp Leu Thr Thr Ser Lys Leu Lys Val Lys Val	
210 215 220	
gat aag aat cca tic aaa ctt agt glg lat aag cct gat gga acg acg	720
Asp Lys Asn Pro Phe Lys Leu Ser Val Tyr Lys Pro Asp Gly Thr Thr	
225 230 235 240	40
tig att gcc cgt caa tat gac agc act acg aat cgt aac att gcc tgg	768
Leu Ile Ala Arg Gln Tyr Asp Ser Thr Thr Asn Arg Asn Ile Ala Trp	
245 250 255	

tta acc aat ggc agt aca atc atc gac aag gta gaa gat cat ttt tat	816	
Leu Thr Asn Gly Ser Thr Ile Ile Asp Lys Val Glu Asp His Phe Tyr		
260 265 270		
ica ccg gct tcc gag gag ttt ttt ggc ttt gga gag cat tac aac aac	864	
Ser Pro Ala Ser Glu Glu Phe Phe Gly Phe Gly Glu His Tyr Asn Asn		
275 280 285		
ttc cgt aaa cgc gga aat gat gig gac acc tat gtg ttc aac cag tat	912	
Phe Arg Lys Arg Gly Asn Asp Val Asp Thr Tyr Val Phe Asn Gln Tyr		10
290 295 300		
aag aat caa aat gac cgc acc tac atg gca att cct ttt atg ctt aac	960	
Lys Asn Gln Asn Asp Arg Thr Tyr Met Ala Ile Pro Phe Met Leu Asn		
305 310 315 320		
agc agc ggt tat ggc att ttc gta aat tca acg tat tat tcc aaa ttt	1008	
Ser Ser Gly Tyr Gly Ile Phe Val Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser Lys Phe		
325 330 335		
cgg ttg gca acc gaa cgc acc gat atg ttc agc ttt acg gct gat aca	1056	
Arg Leu Ala Thr Glu Arg Thr Asp Met Phe Ser Phe Thr Ala Asp Thr		20
340 345 350		
ggg ggt agt gcc gcc tcg atg ctg gat tat tat ttc att tac ggt aat	1104	
Gly Gly Ser Ala Ala Ser Met Leu Asp Tyr Tyr Phe Ile Tyr Gly Asn		
355 360 365		
gat ttg aaa aat gtg gtg agt aac tac gct aac att acc ggt aag cca	1152	
Asp Leu Lys Asn Val Val Ser Asn Tyr Ala Asn Ile Thr Gly Lys Pro		
370 375 380		
aca gcg ctg ccg aaa tgg gct ttc ggg tta tgg atg tca gct aac gag	1200	
Thr Ala Leu Pro Lys Trp Ala Phe Gly Leu Trp Met Ser Ala Asn Glu		30
385 390 395 400		
tgg gat cgt caa acc aag gig aat aca gcc att aat aac gcg aac tcc	1248	
Trp Asp Arg Gln Thr Lys Val Asn Thr Ala Ile Asn Asn Ala Asn Ser		
405 410 415		
aat aat att ccg gct aca gcg gtt gtg ctg gaa cag tgg agt gat gag	1296	
Asn Asn Ile Pro Ala Thr Ala Val Val Leu Glu Gln Trp Ser Asp Glu		
420 425 430		
aac acg ttt tat att ttc aat gat gcc acc tat acc ccg aaa acg ggc	1344	
Asn Thr Phe Tyr Ile Phe Asn Asp Ala Thr Tyr Thr Pro Lys Thr Gly		40
435 440 445		

agt gct gcg cat gcc tat acc gat ttc act ttc ccg aca tct ggg aga	1393	
Ser Ala Ala His Ala Tyr Thr Asp Phe Thr Phe Pro Thr Ser Gly Arg		
450 455 460		
tgg acg gat cca aaa gcg atg gca gac aat gig cat aac aat ggg atg	1440	
Trp Thr Asp Pro Lys Ala Met Ala Asp Asn Val His Asn Asn Gly Met		
465 470 475 480		
aag ctg gig ctt tgg cag gtc cct att cag aaa tgg act tca acg ccc	1488	
Lys Leu Val Leu Trp Gln Val Pro Ile Gln Lys Trp Thr Ser Thr Pro		
485 490 495		10
tat acc cag aaa gat aat gat gaa gcc tat atg acg gct cag aat tat	1536	
Tyr Thr Gln Lys Asp Asn Asp Glu Ala Tyr Met Thr Ala Gln Asn Tyr		
500 505 510		
gca gtt ggc aac ggt agc gga ggc cag tac agg ata cct tca gga caa	1584	
Ala Val Gly Asn Gly Ser Gly Gly Gln Tyr Arg Ile Pro Ser Gly Gln		
515 520 525		
tgg ttc gag aac agt ttg ctg ctt gat ttt acg aat acg gcc gcc aaa	1632	
Trp Phe Glu Asn Ser Leu Leu Leu Asp Phe Thr Asn Thr Ala Ala Lys		20
530 535 540		
aac tgg tgg atg tct aaa cgc gct tat ctg ttt gat ggt gtg ggt atc	1680	
Asn Trp Trp Met Ser Lys Arg Ala Tyr Leu Phe Asp Gly Val Gly Ile		
545 550 555 560		
gac ggc ttc aaa aca gat ggc ggt gaa atg gta tgg ggt cgc tca aat	1728	
Asp Gly Phe Lys Thr Asp Gly Gly Glu Met Val Trp Gly Arg Ser Asn		
565 570 575		
act ttc tca aac ggt aag aaa ggc aat gaa atg cgc aat caa tac ccg	1776	
Thr Phe Ser Asn Gly Lys Lys Gly Asn Glu Met Arg Asn Gln Tyr Pro		30
580 585 590		
aat gag tat gtg aaa gcc tat aac gag tac gcg cgc tcg aag aaa gcc	1824	
Asn Glu Tyr Val Lys Ala Tyr Asn Glu Tyr Ala Arg Ser Lys Lys Ala		
595 600 605		
gat gcg gtc tcc ttt agc cgt tcc ggc acg caa ggc gca cag gcg aat	1872	
Asp Ala Val Ser Phe Ser Arg Ser Gly Thr Gln Gly Ala Gln Ala Asn		
610 615 620		40
cag att ttc tgg tcc ggt gac caa gag tcg acg ttt ggt gct ttt caa	1920	
Gln Ile Phe Trp Ser Gly Asp Gln Glu Ser Thr Phe Gly Ala Phe Gln		
625 630 635 640		

caa gct glg aat gca ggg ctt acg gca agt atg tct ggc gtt cct tat	1968	
Gln Ala Val Asn Ala Gly Leu Thr Ala Ser Met Ser Gly Val Pro Tyr		
645 650 655		
tgg agc tgg gat atg gca ggc ttt aca ggc act tat cca acg gct gag	2016	
Trp Ser Trp Asp Met Ala Gly Phe Thr Gly Thr Tyr Pro Thr Ala Glu		
660 665 670		
ttg tac aaa cgt gct act gaa atg gct gct ttt gca ccg gtc atg cag	2064	
Leu Tyr Lys Arg Ala Thr Glu Met Ala Ala Phe Ala Pro Val Met Gln		
675 680 685		10
ttt cat tcc gag tct aac ggc agc tct ggt atc aac gag gaa cgt tct	2112	
Phe His Ser Glu Ser Asn Gly Ser Ser Gly Ile Asn Glu Glu Arg Ser		
690 695 700		
cca tgg aac gca caa gcg cgt aca ggc gac aat acg atc att agt cat	2160	
Pro Trp Asn Ala Gln Ala Arg Thr Gly Asp Asn Thr Ile Ile Ser His		
705 710 715 720		
ttt gcc aaa tat acg aat acg cgc atg aat ttg ctt cct tat att tat	2208	
Phe Ala Lys Tyr Thr Asn Thr Arg Met Asn Leu Leu Pro Tyr Ile Tyr		20
725 730 735		
agc gaa gcg aag atg gct agt gat act ggc gtt ccc atg atg cgc gcc	2256	
Ser Glu Ala Lys Met Ala Ser Asp Thr Gly Val Pro Met Met Arg Ala		
740 745 750		
atg gcg ctt gaa tat ccg aag gac acg aac acg tac ggt ttg aca caa	2304	
Met Ala Leu Glu Tyr Pro Lys Asp Thr Asn Thr Tyr Gly Leu Thr Gln		
755 760 765		
cag tat atg ttc gga ggt aat tta ctt att gct cct gtt atg aat cag	2352	
Gln Tyr Met Phe Gly Gly Asn Leu Leu Ile Ala Pro Val Met Asn Gln		30
770 775 780		
gga gaa aca aac aag agt att tat ctt ccg cag ggg gat tgg atc gat	2400	
Gly Glu Thr Asn Lys Ser Ile Tyr Leu Pro Gln Gly Asp Trp Ile Asp		
785 790 795 800		
ttc tgg ttc ggt gct cag cgt cct ggc ggt cga aca atc agc tac acg	2448	
Phe Trp Phe Gly Ala Gln Arg Pro Gly Gly Arg Thr Ile Ser Tyr Thr		
805 810 815		
gcc ggc atc gat gat cta ccg gtt ttt glg aag ttt ggc agt att ctt	2496	
Ala Gly Ile Asp Asp Leu Pro Val Phe Val Lys Phe Gly Ser Ile Leu		40
820 825 830		

ccg atg aat ttg aac gcg caa tat caa gig ggc ggg acc att ggc aac	2544	
Pro Met Asn Leu Asn Ala Gln Tyr Gln Val Gly Gly Thr Ile Gly Asn		
835 840 845		
agc ttg acg agc tac acg aat ctg gcg ttc cgc att tat ccg ctt ggg	2592	
Ser Leu Thr Ser Tyr Thr Asn Leu Ala Phe Arg Ile Tyr Pro Leu Gly		
850 855 860		
aca aca acg tac gac tgg aat gat gat att ggc ggt tgc gig aaa acc	2640	
Thr Thr Thr Tyr Asp Trp Asn Asp Asp Ile Gly Gly Ser Val Lys Thr		10
865 870 875 880		
ata act tct aca gag caa tat ggg ttg aat aaa gaa acc gig act gtt	2688	
Ile Thr Ser Thr Glu Gln Tyr Gly Leu Asn Lys Glu Thr Val Thr Val		
885 890 895		
cca gcg att aat tct acc aag aca ttg caa gig ttt acg act aag cct	2736	
Pro Ala Ile Asn Ser Thr Lys Thr Leu Gln Val Phe Thr Thr Lys Pro		
900 905 910		
tcc tct gla acg gtg ggt ggt tct glg atg aca gag tac agt act tta	2784	
Ser Ser Val Thr Val Gly Gly Ser Val Met Thr Glu Tyr Ser Thr Leu		20
915 920 925		
act gcc cta acg gga gcg tgc aca ggc tgg tac tat gat act gla cag	2832	
Thr Ala Leu Thr Gly Ala Ser Thr Gly Trp Tyr Tyr Asp Thr Val Gln		
930 935 940		
aaa itc act tac gtc aag ctt ggt tca agt gca tct gct caa tcc gtt	2880	
Lys Phe Thr Tyr Val Lys Leu Gly Ser Ser Ala Ser Ala Gln Ser Val		
945 950 955 960		
gig cta aat ggc gtt aat aag gtg gaa tat gaa gca gaa ttc ggc gig	2928	
Val Leu Asn Gly Val Asn Lys Val Glu Tyr Glu Ala Glu Phe Gly Val		30
965 970 975		
caa agc ggc gtt tca acg aac acg aac cat gca ggt tat act ggt aca	2976	
Gln Ser Gly Val Ser Thr Asn Thr Asn His Ala Gly Tyr Thr Gly Thr		
980 985 990		
gga ttt glg gac ggc ttt gag act ctt gga gac aat gtt gct ttt gat	3024	
Gly Phe Val Asp Gly Phe Glu Thr Leu Gly Asp Asn Val Ala Phe Asp		
995 1000 1005		
ggt tcc gtc aaa gcc gca ggt act tat acg atg aag gtt cgg tat tca	3072	
Val Ser Val Lys Ala Ala Gly Thr Tyr Thr Met Lys Val Arg Tyr Ser		40
1010 1015 1020		

tcc ggt gca ggc aat ggc tca aga gcc atc tat gtg aat aac acc aaa 3120
 Ser Gly Ala Gly Asn Gly Ser Arg Ala Ile Tyr Val Asn Asn Thr Lys
 1025 1030 1035 1040
 gtg acg gac ctt gcc ttg ccg caa aca aca agc tgg gat aca tgg ggg 3168
 Val Thr Asp Leu Ala Leu Pro Gln Thr Thr Ser Trp Asp Thr Trp Gly
 1045 1050 1055
 act gct acg ttt agc gtc tgc ctg agt aca ggt ctc aac acg gig aaa 3216
 Thr Ala Thr Phe Ser Val Ser Leu Ser Thr Gly Leu Asn Thr Val Lys
 1060 1065 1070
 gtc agc tat gat ggt acc agt tca ctt ggc att aat ttc gat aac atc 3264
 Val Ser Tyr Asp Gly Thr Ser Ser Leu Gly Ile Asn Phe Asp Asn Ile
 1075 1080 1085
 gcg att gta gag caa taa 3282
 Ala Ile Val Glu Gln
 1090

<210> 2

20

<211> 3855

<212> DNA

<213> Bacillus globisporus

<220>

<221> CDS

<222> (1)... (3855)

30

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)... (105)

<400> 2

atg cgt cca cca aac aaa gaa att cca cgt att ctt gct ttt ttt aca 48
 Met Arg Pro Pro Asn Lys Glu Ile Pro Arg Ile Leu Ala Phe Phe Thr
 1 5 10 15
 gcg ttt acg ttg ttt ggt tca acc ctt gcc ttg ctt cct gct ccg cct 96
 Ala Phe Thr Leu Phe Gly Ser Thr Leu Ala Leu Leu Pro Ala Pro Pro
 20 25 30

40

gcg cat gcc tat gtc agc agc cta gga aat ctc att tct tgc agt gtc	144	
Ala His Ala Tyr Val Ser Ser Leu Gly Asn Leu Ile Ser Ser Ser Val		
35 40 45		
acc gga gat acc tgg acg cta act gtt gat aac ggt gcg gag ccg agt	192	
Thr Gly Asp Thr Leu Thr Leu Thr Val Asp Asn Gly Ala Glu Pro Ser		
50 55 60		
gat gac ctc ttg att gtt caa gcg gtt caa aac ggt att ttg aag gtt	240	
Asp Asp Leu Leu Ile Val Gln Ala Val Gln Asn Gly Ile Leu Lys Val		
65 70 75 80		10
gat tat cgt cca aat agc ata acg ccg agc gcg aag acg ccg atg ctg	288	
Asp Tyr Arg Pro Asn Ser Ile Thr Pro Ser Ala Lys Thr Pro Met Leu		
85 90 95		
gat ccg aac aaa act tgg tca gct gta gga gct acg att aat acg aca	336	
Asp Pro Asn Lys Thr Trp Ser Ala Val Gly Ala Thr Ile Asn Thr Thr		
100 105 110		
gcc aat cca atg acc atc acg act tcc aat atg aag att gag att acc	384	
Ala Asn Pro Met Thr Ile Thr Thr Ser Asn Met Lys Ile Glu Ile Thr		20
115 120 125		
aag aat cca gta cga atg acg gtc aag aag gcg gac ggc act acg cta	432	
Lys Asn Pro Val Arg Met Thr Val Lys Lys Ala Asp Gly Thr Thr Leu		
130 135 140		
ttc tgg gaa cca tca ggc gga ggg gta ttc tca gac ggt gtt cgc ttc	480	
Phe Trp Glu Pro Ser Gly Gly Gly Val Phe Ser Asp Gly Val Arg Phe		
145 150 155 160		
ctt cat gcc aca ggg gat aat atg tat ggc atc cgg agc ttc aat gct	528	
Leu His Ala Thr Gly Asp Asn Met Tyr Gly Ile Arg Ser Phe Asn Ala		30
165 170 175		
ttt gat agc ggg ggt gac ctg ctg cgg aat tgc tcc aat cat gcc gcc	576	
Phe Asp Ser Gly Gly Asp Leu Leu Arg Asn Ser Ser Asn His Ala Ala		
180 185 190		
cat gcg ggt gaa cag gga gat tcc ggt ggt ccg ctt att igg agt acg	624	
His Ala Gly Glu Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ile Trp Ser Thr		
195 200 205		
gca gga tat gga cta tta gtc gat agc gat ggc ggc tac ccc tat aca	672	
Ala Gly Tyr Gly Leu Leu Val Asp Ser Asp Gly Gly Tyr Pro Tyr Thr		40
210 215 220		

gat agc aca acc ggt caa atg gag ttt tat tat ggt ggg acc cct cct	720	
Asp Ser Thr Thr Gly Gln Met Glu Phe Tyr Tyr Gly Gly Thr Pro Pro		
225 230 235 240		
gag gga cgt cgt tat gcg aaa caa aac gtg gaa tat tat att atg ctc	768	
Glu Gly Arg Arg Tyr Ala Lys Gln Asn Val Glu Tyr Tyr Ile Met Leu		
245 250 255		
gga acc ccc aag gaa att atg acc gac gla ggg gaa atc aca ggg aaa	816	
Gly Thr Pro Lys Glu Ile Met Thr Asp Val Gly Glu Ile Thr Gly Lys		
260 265 270		10
ccg cct atg ctg cct aag tgg tgg ctt gga ttc atg aac ttt gag tgg	864	
Pro Pro Met Leu Pro Lys Trp Ser Leu Gly Phe Met Asn Phe Glu Trp		
275 280 285		
gat acg aat caa acg gag ttt acg aat aat gtg gat acg tat cgt gcc	912	
Asp Thr Asn Gln Thr Glu Phe Thr Asn Asn Val Asp Thr Tyr Arg Ala		
290 295 300		
aaa aat atc ccc ata gat gct tac gcc ttc gac tat gac tgg aaa aag	960	
Lys Asn Ile Pro Ile Asp Ala Tyr Ala Phe Asp Tyr Asp Trp Lys Lys		20
305 310 315 320		
tac ggg gaa acc aac tat ggt gaa ttc gcg tgg aat acg act aat ttc	1008	
Tyr Gly Glu Thr Asn Tyr Gly Glu Phe Ala Trp Asn Thr Thr Asn Phe		
325 330 335		
cct tct gcg tca acg act tct tta aag tca aca atg gat gct aaa ggc	1056	
Pro Ser Ala Ser Thr Thr Ser Leu Lys Ser Thr Met Asp Ala Lys Gly		
340 345 350		
atc aaa atg atc gga att aca aaa ccc cgc atc gtt acg aag gat gct	1104	
Ile Lys Met Ile Gly Ile Thr Lys Pro Arg Ile Val Thr Lys Asp Ala		30
355 360 365		
tca gcg aat glg acg acc caa ggg acg gac gcg aca aat ggc ggt tat	1152	
Ser Ala Asn Val Thr Thr Gln Gly Thr Asp Ala Thr Asn Gly Gly Tyr		
370 375 380		
ttt tat cca ggc cat aac gag tat cag gat tat ttc att ccc gla act	1200	
Phe Tyr Pro Gly His Asn Glu Tyr Gln Asp Tyr Phe Ile Pro Val Thr		
385 390 395 400		40
gtg cgt agt atc gat cct tac aat gct aac gaa cgt gct tgg ttc tgg	1248	
Val Arg Ser Ile Asp Pro Tyr Asn Ala Asn Glu Arg Ala Trp Phe Trp		
405 410 415		

aat cat tcc aca gat gcg ctt aat aaa ggg atc gta ggt tgg tgg aat 1296
 Asn His Ser Thr Asp Ala Leu Asn Lys Gly Ile Val Gly Trp Trp Asn
 420 425 430
 gac gag acg gat aaa gta tct tgg ggt gga gcg tta tat tgg ttt ggc 1344
 Asp Glu Thr Asp Lys Val Ser Ser Gly Gly Ala Leu Tyr Trp Phe Gly
 435 440 445
 aat ttc aca aca ggc cac atg tct cag acg atg tac gaa ggg ggg cgg 1393
 Asn Phe Thr Thr Gly His Met Ser Gln Thr Met Tyr Glu Gly Gly Arg
 450 455 460
 gct tac acg agt gga gcg cag cgt gtt tgg caa acg gct aga acc ttc 1440
 Ala Tyr Thr Ser Gly Ala Gln Arg Val Trp Gln Thr Ala Arg Thr Phe
 465 470 475 480
 tac cca ggt gcc cag cgg tat gcg act acg ctt tgg tct ggc gat att 1488
 Tyr Pro Gly Ala Gln Arg Tyr Ala Thr Thr Leu Trp Ser Gly Asp Ile
 485 490 495
 ggc att caa tac aat aaa ggc gaa cgg atc aat tgg gct gcc ggg atg 1536
 Gly Ile Gln Tyr Asn Lys Gly Glu Arg Ile Asn Trp Ala Ala Gly Met
 500 505 510
 cag gag caa agg gca gtt atg cta tcc tcc gtg aac aat ggc cag gtg 1584
 Gln Glu Gln Arg Ala Val Met Leu Ser Ser Val Asn Asn Gly Gln Val
 515 520 525
 aaa tgg ggc atg gat acc ggc gga ttc aat cag cag gat ggc acg acg 1632
 Lys Trp Gly Met Asp Thr Gly Gly Phe Asn Gln Gln Asp Gly Thr Thr
 530 535 540
 aac aat ccg aat ccc gat tta tac gct cgg tgg atg cag ttc agt gcc 1680
 Asn Asn Pro Asn Pro Asp Leu Tyr Ala Arg Trp Met Gln Phe Ser Ala
 545 550 555 560
 cta acg cct gtt ttc cga gtg cat ggg aac aac cat cag cag cgc cag 1728
 Leu Thr Pro Val Phe Arg Val His Gly Asn Asn His Gln Gln Arg Gln
 565 570 575
 cca tgg tac ttc gga tgg act gcg gag gag gcc tcc aaa gag gca att 1776
 Pro Trp Tyr Phe Gly Ser Thr Ala Glu Glu Ala Ser Lys Glu Ala Ile
 580 585 590
 cag ctg cgg tac tcc ctg atc cct tat atg tat gcc tat gag aga agt 1824
 Gln Leu Arg Tyr Ser Leu Ile Pro Tyr Met Tyr Ala Tyr Glu Arg Ser
 595 600 605

10

20

30

40

gct tac gag aat ggg aat ggg ctc gtt cgg cca ttg atg caa gcc tat	1872	
Ala Tyr Glu Asn Gly Asn Gly Leu Val Arg Pro Leu Met Gln Ala Tyr		
610 615 620		
cca aca gat gcg gcc gtc aaa aat tac acg gat gct tgg atg ttt ggt	1920	
Pro Thr Asp Ala Ala Val Lys Asn Tyr Thr Asp Ala Trp Met Phe Gly		
625 630 635 640		
gac tgg ctg ctg gct gca cct gtg gla gat aaa cag cag acg agt aag	1968	
Asp Trp Leu Leu Ala Ala Pro Val Val Asp Lys Gln Gln Thr Ser Lys		
645 650 655		10
gat aic tat tta ccg tct ggg tca tgg att gac tat gcg cga ggc aat	2016	
Asp Ile Tyr Leu Pro Ser Gly Ser Trp Ile Asp Tyr Ala Arg Gly Asn		
660 665 670		
gca ata act ggc ggt caa acc atc cga tat tcg gtt aat ccg gac acg	2064	
Ala Ile Thr Gly Gly Gln Thr Ile Arg Tyr Ser Val Asn Pro Asp Thr		
675 680 685		
ttg aca gac atg cct ctc ttt aat aaa aaa ggt gcc aat att cca aca	2112	
Leu Thr Asp Met Pro Leu Phe Ile Lys Lys Gly Ala Ile Ile Pro Thr		20
690 695 700		
cag aaa gtg cag gat tac gla ggg cag gct tcc gtc act tcc gtt gat	2160	
Gln Lys Val Gln Asp Tyr Val Gly Gln Ala Ser Val Thr Ser Val Asp		
705 710 715 720		
gtg gat gtg ttt ccg gat acg acg cag tcg agt ttc acg tac tac gat	2208	
Val Asp Val Phe Pro Asp Thr Thr Gln Ser Ser Phe Thr Tyr Tyr Asp		
725 730 735		
gat gat ggc gcc agt tat aac tat gag agc ggc act tat ttt aag caa	2256	
Asp Asp Gly Ala Ser Tyr Asn Tyr Glu Ser Gly Thr Tyr Phe Lys Gln		30
740 745 750		
aat atg act gct cag gat aat ggg tca ggc tcg tia agt ttt act tia	2304	
Asn Met Thr Ala Gln Asp Asn Gly Ser Gly Ser Leu Ser Phe Thr Leu		
755 760 765		
gga gca aag agt ggc agt tac acg ccg gct ctc caa tcc tat atc gtt	2352	
Gly Ala Lys Ser Gly Ser Tyr Thr Pro Ala Leu Gln Ser Tyr Ile Val		
770 775 780		40
aag ctg cac ggt tct gct gga act tct gtt acg aat aac agc gca gct	2400	
Lys Leu His Gly Ser Ala Gly Thr Ser Val Thr Asn Asn Ser Ala Ala		
785 790 795 800		

alg aca tct tat gca agc ttg gaa gca tta aaa gct gct gct ggg gaa 2448
 Met Thr Ser Tyr Ala Ser Leu Glu Ala Leu Lys Ala Ala Ala Gly Glu
 805 810 815
 ggc tgg gcg act ggg aag gac att tat ggg gat gtc acc tat gtg aaa 2496
 Gly Trp Ala Thr Gly Lys Asp Ile Tyr Gly Asp Val Thr Tyr Val Lys
 820 825 830
 gig acg gca ggt aca gct tct tct aaa tct att gct gtt aca ggt gtt 2544
 Val Thr Ala Gly Thr Ala Ser Ser Lys Ser Ile Ala Val Thr Gly Val
 835 840 845
 gct gcc gtg agc gca act act tcg caa tac gaa gct gag gat gca tcg 2592
 Ala Ala Val Ser Ala Thr Thr Ser Gln Tyr Glu Ala Glu Asp Ala Ser
 850 855 860
 ctt tct ggc aat tcg gtt gct gca aag gcg tcc ata aac acg aat cat 2640
 Leu Ser Gly Asn Ser Val Ala Ala Lys Ala Ser Ile Asn Thr Asn His
 865 870 875 880
 acc gga tat acg gga act gga ttt gta gat ggt ttg ggg aat gat ggc 2688
 Thr Gly Tyr Thr Gly Thr Gly Phe Val Asp Gly Leu Gly Asn Asp Gly
 885 890 895
 gct ggt gtc acc ttc tat cca aag gtg aaa act ggc ggt gac tac aat 2736
 Ala Gly Val Thr Phe Tyr Pro Lys Val Lys Thr Gly Gly Asp Tyr Asn
 900 905 910
 gtc tcc ttg cgt tat gcg aat gct tca ggc acg gct aag tca gtc agt 2784
 Val Ser Leu Arg Tyr Ala Asn Ala Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Ser
 915 920 925
 att ttt gtt aat gga aaa aga gtg aag tcc acc tcg ctc gct aat ctc 2832
 Ile Phe Val Asn Gly Lys Arg Val Lys Ser Thr Ser Leu Ala Asn Leu
 930 935 940
 gca aat tgg gac act tgg tct aca caa tct gag aca ctc ccg ttg acg 2880
 Ala Asn Trp Asp Thr Trp Ser Thr Gln Ser Glu Thr Leu Pro Leu Thr
 945 950 955 960
 gca ggt gtg aat gtt gtg acc tat aaa tat tac tcc gat gcg gga gat 2928
 Ala Gly Val Asn Val Val Thr Tyr Lys Tyr Tyr Ser Asp Ala Gly Asp
 965 970 975
 aca ggc aat gtt aac atc gac aac atc acg gla cct ttt gcg cca att 2976
 Thr Gly Asn Val Asn Ile Asp Asn Ile Thr Val Pro Phe Ala Pro Ile
 980 985 990

10

20

30

40

atc ggt aag tat gaa gca gag agt gct gag ctt tct ggt ggc agc tca 3024
 Ile Gly Lys Tyr Glu Ala Glu Ser Ala Glu Leu Ser Gly Gly Ser Ser
 995 1000 1005
 ttg aac acg aac cat tgg tac tac agt ggt acg gct ttt gta gac ggt 3072
 Leu Asn Thr Asn His Trp Tyr Tyr Ser Gly Thr Ala Phe Val Asp Gly
 1010 1015 1020
 ttg agt gct gta ggc gcg cag gtg aaa tac aac gtg aat gtc cct agc 3120
 Leu Ser Ala Val Gly Ala Gln Val Lys Tyr Asn Val Asn Val Pro Ser
 1025 1030 1035 1040
 gca gga agt tat cag gta gcg ctg cga tat gcg aat ggc agt gca gcg 3168
 Ala Gly Ser Tyr Gln Val Ala Leu Arg Tyr Ala Asn Gly Ser Ala Ala
 1045 1050 1055
 acg aaa acg ttg agt act tat atc aat gga gcc aag ctg ggg caa acc 3216
 Thr Lys Thr Leu Ser Thr Tyr Ile Asn Gly Ala Lys Leu Gly Gln Thr
 1060 1065 1070
 agt ttt acg agt cct ggt acg aat tgg aat gtt tgg cag gat aat gtg 3264
 Ser Phe Thr Ser Pro Gly Thr Asn Trp Asn Val Trp Gln Asp Asn Val
 1075 1080 1085
 caa acg gtg acg tta aat gca ggg gca aac acg att gcg ttt aaa tac 3312
 Gln Thr Val Thr Leu Asn Ala Gly Ala Asn Thr Ile Ala Phe Lys Tyr
 1090 1095 1100
 gac gcc gct gac agc ggg aac atc aac gta gat cgt ctg ctt ctt tca 3360
 Asp Ala Ala Asp Ser Gly Asn Ile Asn Val Asp Arg Leu Leu Leu Ser
 1105 1110 1115 1120
 act tcg gca gcg gga acg ccg gtt tct gag cag aac ctg cta gac aat 3408
 Thr Ser Ala Ala Gly Thr Pro Val Ser Glu Gln Asn Leu Leu Asp Asn
 1125 1130 1135
 ccc ggt ttc gag cgt gac acg agt caa acc aat aac tgg att gag tgg 3456
 Pro Gly Phe Glu Arg Asp Thr Ser Gln Thr Asn Asn Trp Ile Glu Trp
 1140 1145 1150
 cat cca ggc acg caa gct gtt gct ttt ggc gtt gat agc ggc tca acc 3504
 His Pro Gly Thr Gln Ala Val Ala Phe Gly Val Asp Ser Gly Ser Thr
 1155 1160 1165
 acc aat ccg ccg gaa tcc ccg tgg tcg ggt gat aag cgt gcc tac ttc 3552
 Thr Asn Pro Pro Glu Ser Pro Trp Ser Gly Asp Lys Arg Ala Tyr Phe
 1170 1175 1180

10

20

30

40

```

tll gca gca ggt gcc tat caa caa agc aic cat caa acc att agt gtt 3600
Phe Ala Ala Gly Ala Tyr Gln Gln Ser Ile His Gln Thr Ile Ser Val
1185          1190          1195          1200
ccf gll aat aat gta aaa tac aaa ttt gaa gcc tgg glc cgc atg aag 3648
Pro Val Asn Asn Val Lys Tyr Lys Phe Glu Ala Trp Val Arg Met Lys
          1205          1210          1215
aat acg acg ccg acg acg gca aga gcc gaa att caa aac tat ggc gga 3696
Asn Thr Thr Pro Thr Thr Ala Arg Ala Gln Ile Gln Asn Tyr Gly Gly
          1220          1225          1230
tca gcc att tat gcg aac ata agt aac agc ggt gtt tgg aaa tat aic 3744
Ser Ala Ile Tyr Ala Asn Ile Ser Asn Ser Gly Val Trp Lys Tyr Ile
          1235          1240          1245
agc gta agt gat att atg gtg acc aat ggt cag ata gat gtt gga ttt 3792
Ser Val Ser Asp Ile Met Val Thr Asn Gly Gln Ile Asp Val Gly Phe
          1250          1255          1260
tac glg gat tca cct ggt gga act acg ctt cac att gat gat gtg cgc 3840
Tyr Val Asp Ser Pro Gly Gly Thr Thr Leu His Ile Asp Asp Val Arg
          1265          1270          1275          1280
gia acc aaa caa taa 3855
Val Thr Lys Gln

```

10

20

【図面の簡単な説明】

第1図は、環状四糖のHPLCによるクロマトグラムである。

第2図は、環状四糖の¹H-NMRスペクトルである。

第3図は、環状四糖の¹³C-NMRスペクトルである。

30

第4図は、本発明の分岐環状四糖（化学式1）の¹³C-NMRスペクトルである。

第5図は、本発明の分岐環状四糖（化学式3）の¹³C-NMRスペクトルである。

第6図は、本発明の分岐環状四糖（化学式4）の¹³C-NMRスペクトルである。

第7図は、本発明の分岐環状四糖（化学式5）の¹³C-NMRスペクトルである。

第8a図、第8b図はそれぞれ、環状四糖とα-シクロデキストリンの混合液にCGTaseを作用させた反応液のHPLCによるクロマトグラム（a）と、該CGTase作用後にグルコアミラーゼを作用させた反応液のHPLCによるクロマトグラム（b）である。

第9図は、本発明の分岐環状四糖（化学式2）の¹³C-NMRスペクトルである。

第10図は、本発明の分岐環状四糖（化学式6）の¹³C-NMRスペクトルである。

40

第11図は、本発明の分岐環状四糖（化学式8）の¹³C-NMRスペクトルである。

第12図は、本発明の分岐環状四糖（化学式7）の¹³C-NMRスペクトルである。

第13図は、本発明の分岐環状四糖（化学式9）の¹³C-NMRスペクトルである。

第14図は、本発明の分岐環状四糖（化学式10）の¹³C-NMRスペクトルである。

第15図は、本発明の分岐環状四糖（化学式1）の結晶のX線回折図形である。

第16図は、本発明の分岐環状四糖（化学式2）の結晶のX線回折図形である。

第17図は、本発明の分岐環状四糖（化学式3）の結晶のX線回折図形である。

第18図は、本発明の分岐環状四糖（化学式6）の結晶のX線回折図形である。

第19図は、本発明の分岐環状四糖（化学式7）の結晶のX線回折図形である。

第20図は、本発明の分岐環状四糖（化学式1）を熱重量分析により熱特性を分析した結 50

果を示す図である。

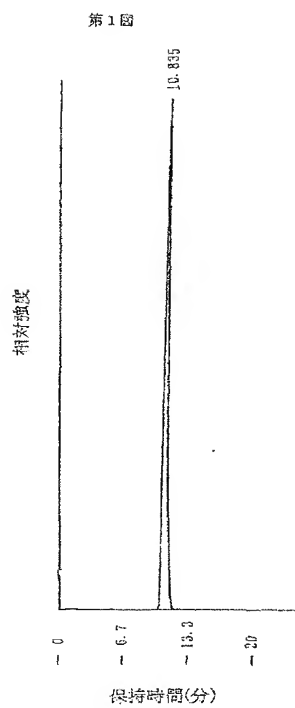
第21図は、本発明の分岐環状四糖（化学式2）を熱重量分析により熱特性を分析した結果を示す図である。

第22図は、本発明の分岐環状四糖（化学式3）を熱重量分析により熱特性を分析した結果を示す図である。

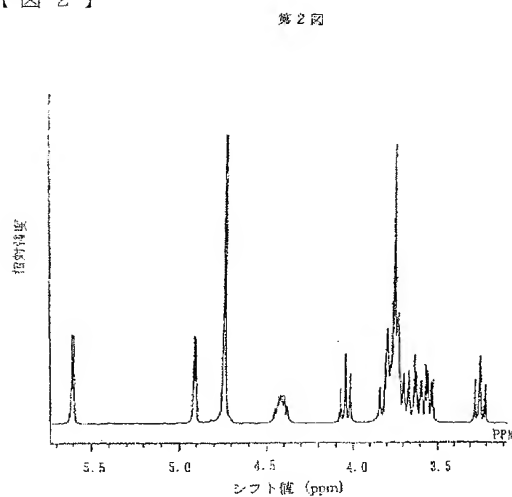
第23図は、本発明の分岐環状四糖（化学式6）を熱重量分析により熱特性を分析した結果を示す図である。

第24図は、本発明の分岐環状四糖（化学式7）を熱重量分析により熱特性を分析した結果を示す図である。

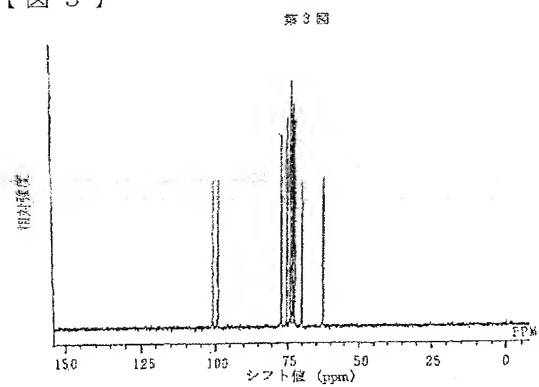
【 図 1 】



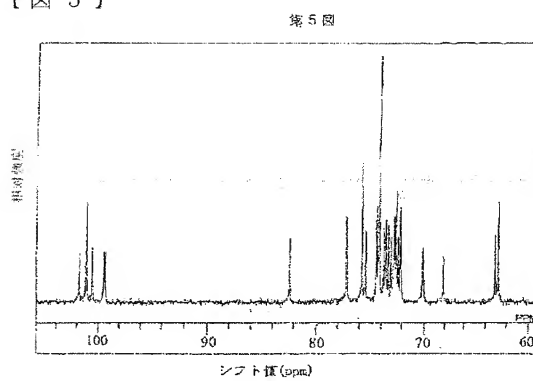
【 図 2 】



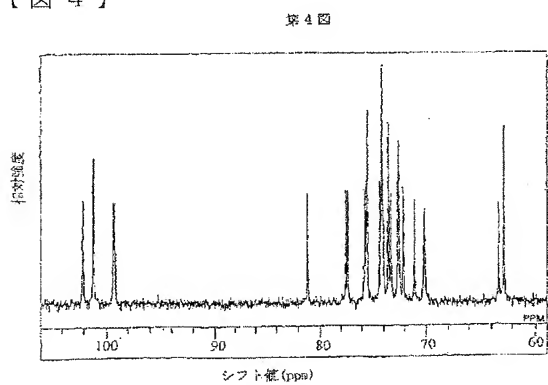
【 図 3 】



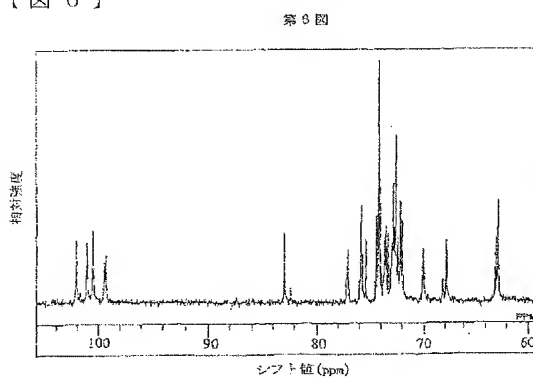
【 図 5 】



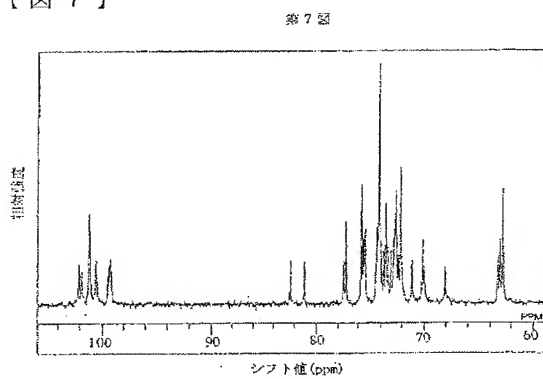
【 図 4 】



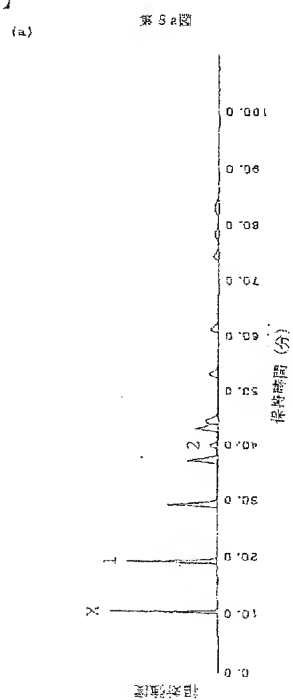
【 図 6 】



【 図 7 】



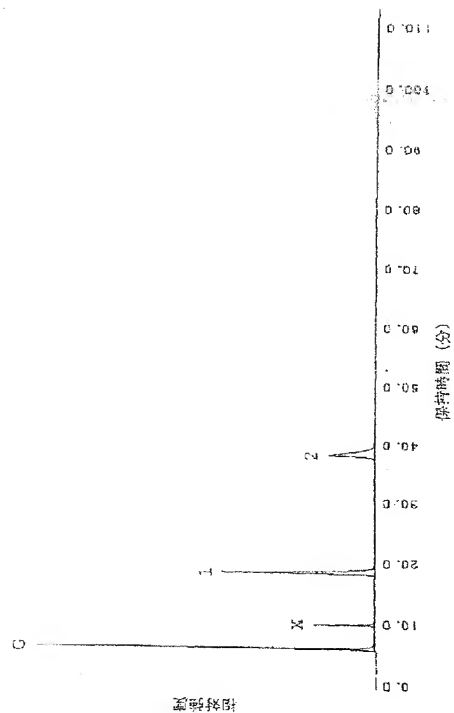
【 図 8 a 】



【 図 8 b 】

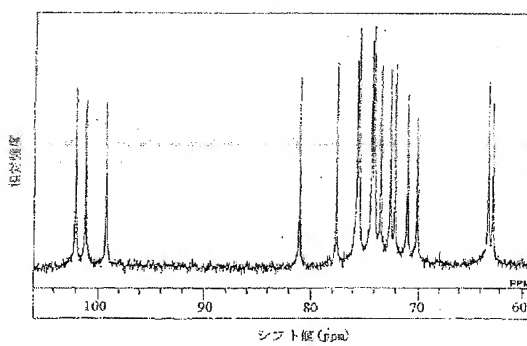
(b)

第 8 b 図



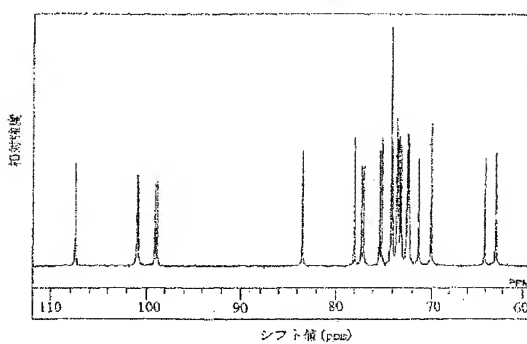
【 図 9 】

第 9 図



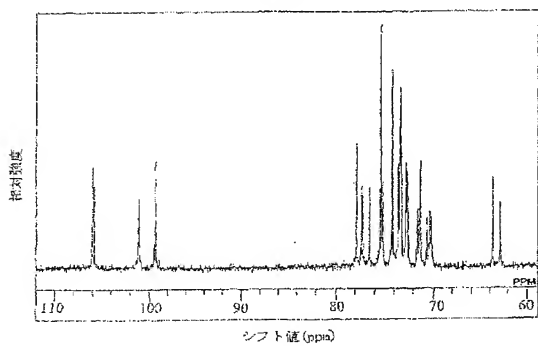
【 図 1 0 】

第 1 0 図



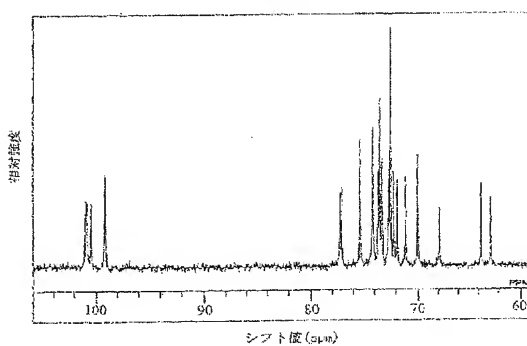
【 図 1 1 】

第 1 1 図



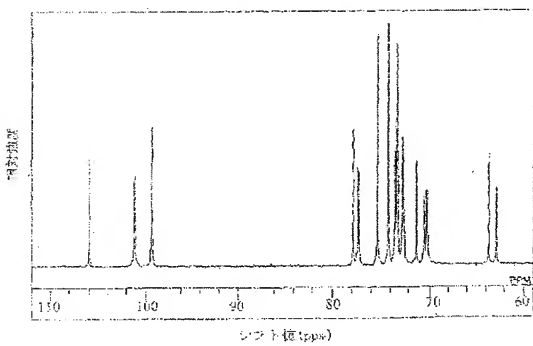
【 図 1 3 】

第 1 3 図



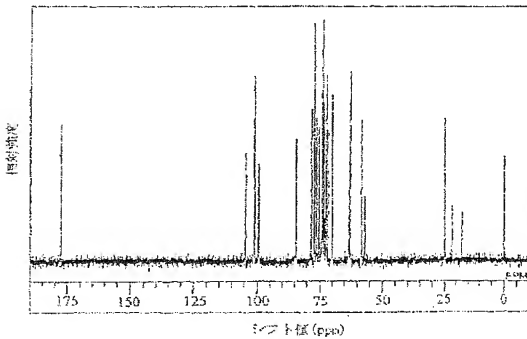
【 図 1 2 】

第 1 2 図



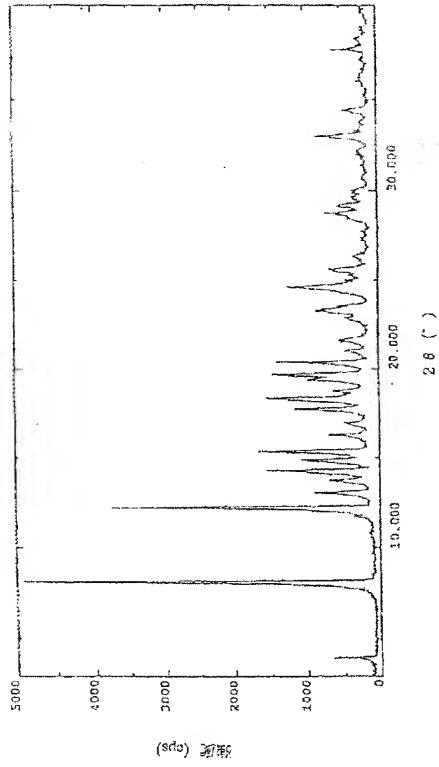
【 図 1 4 】

第 1 4 図



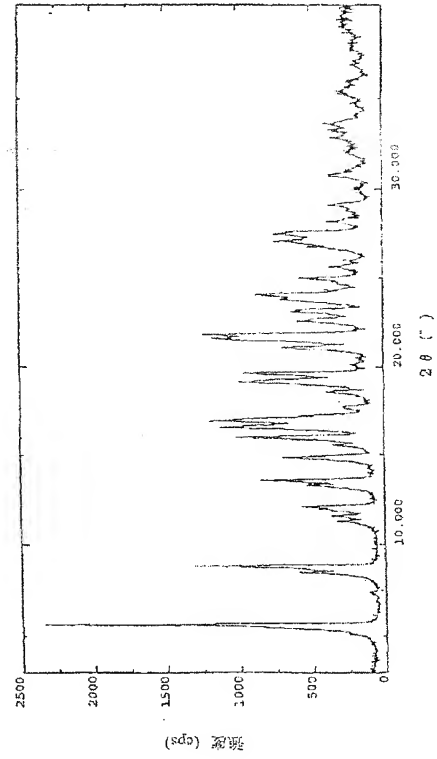
【 図 1 5 】

第 1 5 図



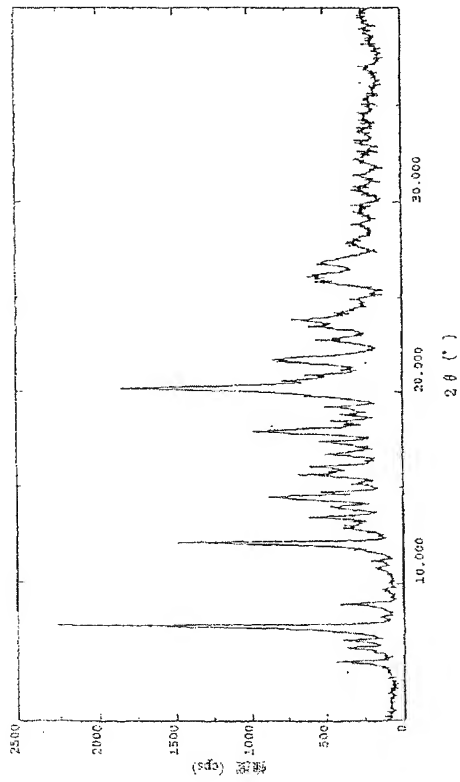
【 図 1 6 】

第 1 6 図



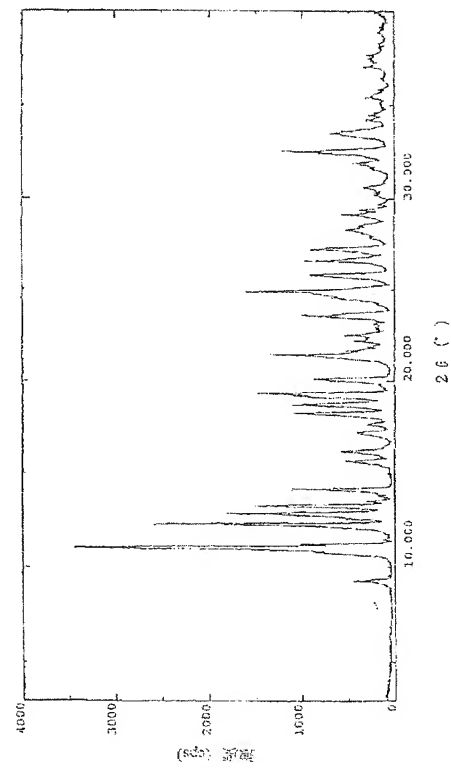
【 図 1 7 】

第 1 7 図



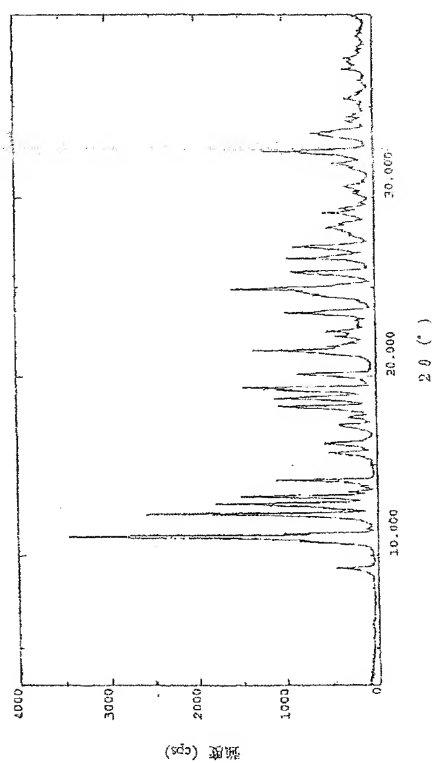
【 図 1 8 】

第 1 8 図



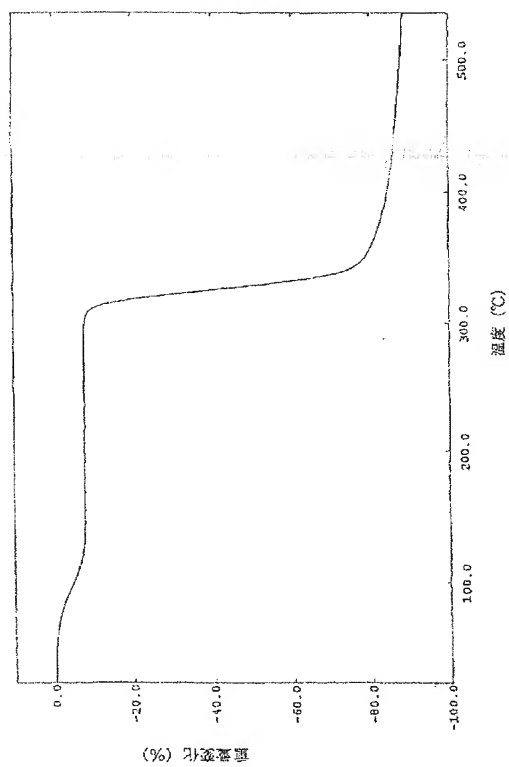
【 図 1 9 】

第 1 9 図



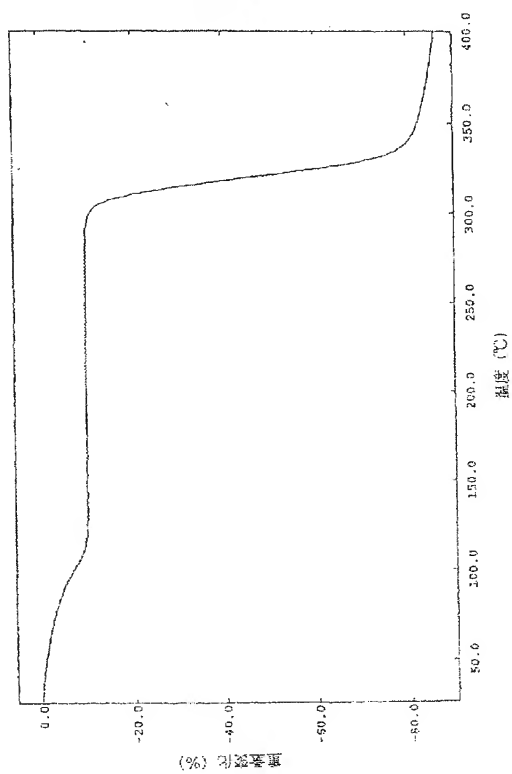
【 図 2 0 】

第 2 0 図



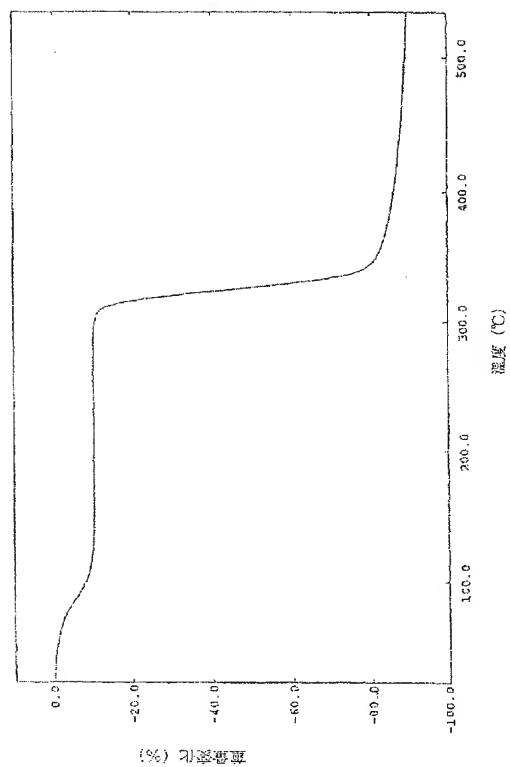
【 図 2 1 】

第 2 1 図



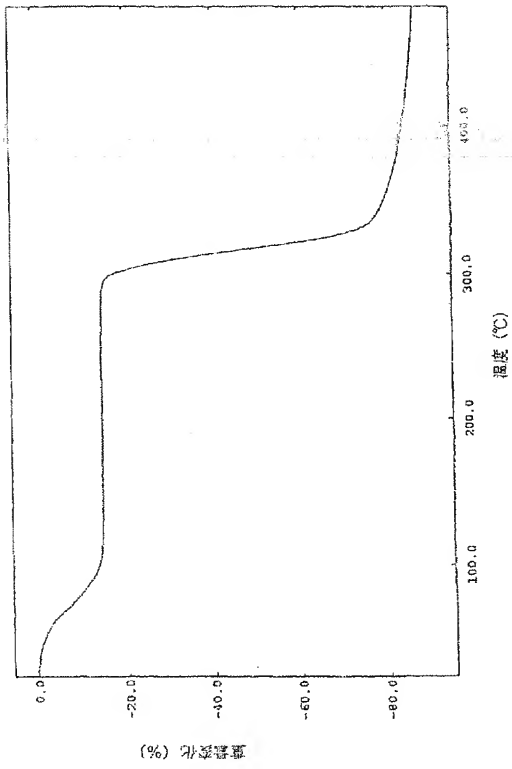
【 図 2 2 】

第 2 2 図



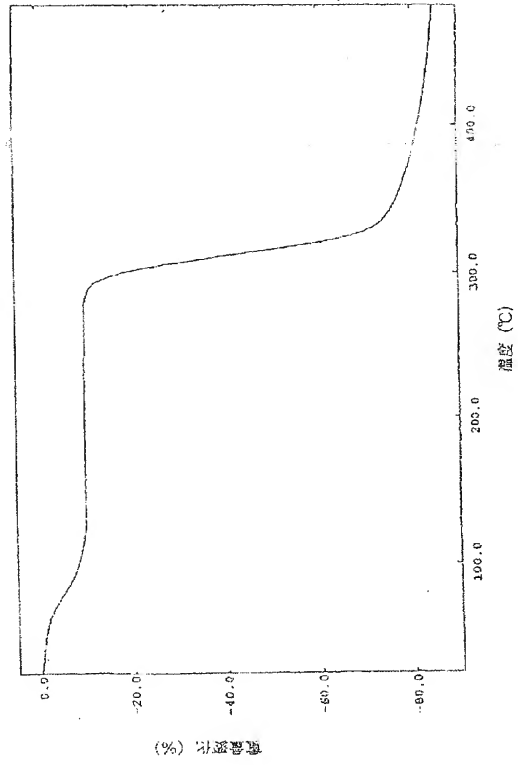
【 図 2 3 】

第 2 3 図



【 図 2 4 】

第 2 4 図



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/02213
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ C07H/06, C08B37/00, C12P19/00, A23L1/30<A61K47/26, 7/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. ⁷ C07H/06, C08B37/00, C12P19/00, A23L1/30<A61K47/26, 7/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), RRSISTRY (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WO 02/10361 A1 (Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo), 07 February, 2002 (07.02.02), (Family: none) * Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, OH, USA), DN.136:163295	1-29
P, A	WO 01/90338 A1 (Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo), 29 November, 2001 (29.11.01), (Family: none) * Database CAPLUS on STN, American Chemical Society (ACS), (Columbus, OH, USA), DN.136:2254	1-29
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified) "O" document affecting so on oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "X" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered as obvious or cannot be constructed to involve an inventive step when the document is taken alone "Z" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art "A" document: member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 May, 2002 (15.05.02)		Date of mailing of this international search report 28 May, 2002 (28.05.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/02213

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5786196 A (The United States of America as Represented by the Secretary of Agriculture), 28 July 1998 (28.07.98), & US 5889179 A & US 5886776 A	1-25

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO2/02213	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl. 07H/06, C08B37/00, C12P19/00, A23L3/30C461K47/26, 7/00			
B. 調査を行った分野			
調査を行った電子データベース (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl. 07H/06, C08B37/00, C12P19/00, A23L3/30C461K47/26, 7/00			
最小販賣単位以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に利用した用語)			
CAPLUS (STM), REGISTRY (STM), MEDLINE (STM), EMBASE (STM)			
C. 関連すると思われる文献			
引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一語の補記が関連するときは、その関連する文献の表示	関連する 論文の順序の番号	
PA	WO 02/10361 A1 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKUTSUJO) 2002.02.07 (ファミリーなし) & Database CAPLUS on STM, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), EN. 136:363295	1-29	
PA	WO 01/90338 A1 (KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKUTSUJO) 2001.11.29 (ファミリーなし) & Database CAPLUS on STM, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY (ACS), (Columbus, OH, USA), EN. 136:2254	1-29	
<input checked="" type="checkbox"/> C 欄の記述にも文が添付されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を添付。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願目的の文献または特許であるが、国際出願目録に公表されたもの 「L」優先権主張に反論を絶する文献又は他の文献の発行日遅くは他の特許の理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」出願による発明、使用、販売等に寄与する文献 「P」国際出願日時点で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
の日付後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願を支持するものではなく、発明の保護又は議論の便宜のために引用するもの 「X」特に関係のある文献であって、当該文献のみで発明の明瞭性又は可能性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の「Y」以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって発明性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日		国際調査報告の発送日	
15.05.02		28.05.02	
国際調査機関の名称及び所在地 日本特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (特許のある職員) 森井 隆徳 電話番号 03-3581-1101 内線 3451	

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

国際調査報告		国際出願番号
C (注) 1. 照会すると認められる文獻		PCT/JP02/02213
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一頁の要約が照会するとともに、その照会する権利の表示	照会する 請求の範囲の番号
A	US 5766196 A (THE UNITED STATES OF AMERICA AS REPRESENTED BY THE SECRETARY OF AGRICULTURE) 1998.07.28 & US 5889175 A & US 5889775 A	1-29

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	F I	
A 6 1 K 31/702	A 6 1 K 31/702	
A 6 1 P 3/02	A 6 1 P 3/02	
A 6 1 P 3/04	A 6 1 P 3/04	
C 0 7 H 1/00	C 0 7 H 1/00	
C 0 8 B 37/00	C 0 8 B 37/00	G
C 1 2 P 19/16	C 1 2 P 19/16	
C 1 2 P 19/18	C 1 2 P 19/16	Z N A
C 1 2 P 19/26	C 1 2 P 19/18	
C 1 3 K 13/00	C 1 2 P 19/26	
// A 2 3 G 3/00	C 1 3 K 13/00	
A 2 3 L 1/236	A 2 3 G 3/00	1 0 1
A 2 3 L 2/38	A 2 3 L 1/236	A
	A 2 3 L 2/38	G

(72)発明者 久保田 倫夫

日本国岡山県岡山市下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項 (実用新案法第48条の13第2項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。